

学位論文 乙第 69 号

涙液分泌、神経軸索伸長および角膜上皮修復に及ぼす

生体内タンパク質の薬理学的研究

— ドライアイ治療薬の選択肢拡充を目指した基礎研究 —

Pharmacological study of the effects of biological proteins on  
lacrimation, neurite outgrowth and corneal wound healing

— Basic research for the purpose of  
increasing the treatment option of dry eye drugs —

平成 28 年 7 月

武庫川女子大学

薬学研究科 薬科学専攻

藤井 敦子

## 目 次

緒論	3
第1章 Lacritin による涙液タンパク質の分泌促進作用	5
第1節 Lacritin によるサル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌作用の検討	6
第2節 サル主涙腺腺房細胞の培養系における炎症モデルの作成	11
第3節 サイトカイン処理したサル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌作用	15
小括	18
第2章 PACAP による三叉神経の軸索伸長作用	19
第1章 PACAP によるサル三叉神経節細胞からの軸索伸長効果	20
第2章 受容体発現と神経軸索伸長のメカニズム	26
第3章 PACAP による涙液タンパク質分泌促進作用	32
小括	34
第3章 Galectin-3 による角膜上皮の創傷治癒作用	35
第1章 Galectin-3 によるラット角膜の上皮修復促進作用と collagen IV の関与	36
第2章 サル角膜器官培養における上皮欠損モデルの比較	43
第3章 Galectin-3 によるサル角膜の上皮修復促進作用とメカニズム	49
小括	56
総括	57
謝辞	61
参考文献	62

## 緒 論

ドライアイは「様々な要因による涙液および角結膜上皮の慢性疾患であり、眼不快感や視機能異常を伴う」と定義される眼疾患であり<sup>1)</sup>、日本国内の患者数は2000万人以上にのぼるとも言われている。ドライアイのメカニズムに関しては、現在、日本と米国および諸外国とで考え方が異なる点もあるが、共通して涙液層の安定性の低下が言われている<sup>2)</sup>。

眼表面の構造は、角結膜上皮とそれを覆う涙液層から成り、涙液層はさらに、液層と油層に分けられる。液層には、水分、電解質と共に、漿液性の涙腺から分泌された涙液タンパク質が含まれ、角膜の栄養源となっている。また、結膜の杯細胞から分泌された分泌型ムチンも液層に存在し、水分をゲル状に保つことで、液層の安定化に寄与している。一方、角結膜の上皮細胞表面に結合している膜型ムチンは、細胞表面と液層をつなぎ、眼表面の水濡れ性を維持している<sup>2)</sup>。最表層には、脂腺であるマイボーム腺から分泌された油分が油層を形成して液層を覆い、水分の蒸発を防ぐと共に、瞬目・開瞼時に液層を引き連れて眼表面に涙液層を伸展させている。

かつて涙液減少症や乾性角結膜炎と言われていたドライアイは、近年急速に病態理解が深まり、現在では、より複雑な眼表面の複合的な異常として捉えられるようになってきた<sup>3)</sup>。ドライアイでは、涙液の各分泌腺の異常から加齢や生活習慣などの様々な要因によって、涙液減少、蒸発亢進、水濡れ性の低下が引き起こされた結果、涙液層の安定性が低下し、涙液層が破綻した箇所から上皮が障害される。また、蒸発亢進により涙液の浸透圧が上昇すると、炎症性物質が誘導され、上皮細胞が障害を受ける<sup>4)</sup>。障害を受けた上皮の上では、涙液層の安定性が低下し、悪循環を生じる。角膜は知覚神経である三叉神経に支配されており、上皮障害は、知覚を刺激して眼不快感の症状を呈する。本来、角膜上皮は自己修復能の高い組織であり、涙液中には、上皮修復を促す成分も含まれている。涙腺からの涙液分泌は、自律神経による調節に加え、三叉神経による支配も受けており、通常、角膜に異常を感知すると、その知覚刺激が涙腺にフィードバックされて涙液分泌を促進し（反射分泌）、上皮を保護・修復しようとする機構が働く<sup>5)</sup>。しかし、ドライアイで増加した炎症性サイトカインは神経伝達物質による涙液分泌を抑制するため<sup>6)</sup>、このフィードバック機能が低下し、涙液分泌が減少し、上皮障害を悪化させる。重症化したドライアイでは、角膜上の三叉神経も障害され、知覚の低下が更なる悪循環につながる。

このように、涙液、上皮、神経がお互いに影響し合って、眼表面を健常に保つように働いていることから、ドライアイの治療および重症化の予防には、原因や症状に合わせて、これらいずれへもアプローチできる治療薬が必要となる。近年日本では、従来の水分補給

を目的とした人工涙液や保水性の高いヒアルロン酸点眼液に加えて、ムチンの産生を増加して、涙液層の安定性を向上させる作用機序のドライアイ治療薬が上市された<sup>7)</sup>。しかし、上述のとおり複雑なドライアイを治療するには、水分保持とムチン産生だけでは選択肢が十分であるとは言えず、効果が不十分な重症例には、外科的処置や自己血清点眼や、適応外のステロイド剤等が用いられている<sup>8)</sup>。治療薬の選択肢の拡充が求められており、そのためには、既存薬とは異なる作用機序の治療薬開発が必要であると考えられる。そこで本研究では、涙液タンパク質分泌、三叉神経修復、角膜上皮修復をターゲットにして、それぞれ以下の3つの生体内タンパク質の薬理作用を検討し、そのメカニズムを調べた。

第1章では、涙液成分を含む涙液の増加を狙って、**lacritin** による主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌作用について調べた。また、ドライアイによる炎症状態を再現したモデルで、**lacritin** と神経伝達物質による作用を比較した。第2章では、涙液の反射分泌機構の回復を狙って、三叉神経に注目し、**pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP)** による神経軸索伸長作用について、関連する受容体の発現と合わせて調べた。さらに、**PACAP** による主涙腺からの直接的な涙液タンパク質分泌作用についても検討した。最後に、第3章では、涙液の安定性および眼不快感や視機能の改善を狙って、**galectin-3** による角膜上皮修復作用とそのメカニズムを調べた。

## 第1章 Lacritinによる涙液タンパク質の分泌促進作用

まず、涙液タンパク質分泌を促進する候補物質として、lacritin に注目した。

Lacritinは涙液中に存在する涙液タンパク質の一つであり、主に霊長類の涙腺に選択的に発現していることが知られている<sup>9,10</sup>。また、lacritinは、主涙腺腺房細胞内では分泌顆粒と一緒に分布しており、副交感神経作動薬の刺激によって細胞内シグナルが活性化されると、細胞外へと分泌される<sup>11</sup>。涙液中のlacritin量は、眼瞼炎やドライアイ患者で減少していることが報告されており<sup>12,13</sup>、lacritinが涙液や眼表面の健常性維持に貢献していると予想される。実際に、lacritinの刺激によるラット涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌促進や<sup>10</sup>、lacritinの点眼によるウサギ涙液量の増加も報告されている<sup>14</sup>。

一方、ドライアイ患者の涙液や涙腺では、炎症性サイトカインが増加することが知られているが<sup>15,16,17</sup>、近年、この炎症が涙液タンパク質の分泌を抑制することが分かってきた。例えば、マウスの涙腺炎症モデルにおいて、神経伝達物質の分泌が減少しただけでなく<sup>18</sup>、炎症性サイトカイン存在下では、神経伝達物質による涙液タンパク質の分泌減少が認められた<sup>6</sup>。涙液タンパク質の一つであるlacritinが、眼瞼炎やドライアイ患者で減少しているのも、炎症による影響が考えられる。

そこで、本章では、よりヒトに近いサルの主涙腺腺房細胞を用いて、lacritinによる涙液分泌作用を調べ、通常の細胞からの分泌作用と、ドライアイを模した炎症状態下での作用とを比較することにした。

## 第1章 — 第1節

### Lacritin によるサル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌作用の検討

#### 1-1-1 目的

Lacritin がサル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌を促進するかどうか、またそのメカニズムの一つとして、細胞内カルシウムイオン濃度が変化するかどうかを調べた。

#### 1-1-2 実験材料および方法

##### 1-1-2-1 実験動物

サルの主涙腺は、Oregon National Primate Research Center のアカゲザル (*Macaca mulatta*) から、本研究とは別の目的で解剖された際に入手した。涙液は、株式会社イブ バイオサイエンスにて、カニクイザル (*Macaca fascicularis*) から採取した。動物の飼育および取扱いは、眼科・視覚研究における動物実験指針 (ARVO Statement for the use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and the Guiding Principles in the Care and Use of Animals) に従った。

##### 1-1-2-2 サル涙液からの lacritin 精製

モンキーチェアに保定したカニクイザルに、生理食塩液（大塚製薬工場）を 50  $\mu$ l 点眼した後、数回瞬目させて涙液となじませた希釈涙液を回収した。集めた希釈涙液 20 ml を 80 ml の 50 mM リン酸ナトリウム水溶液 (pH 7.0) と混合し、陽イオン交換カラム (HiTrap SP Sepharose; GE Healthcare Life Sciences) を通して、10 mM 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸ナトリウム水溶液で抽出した。Lacritin を含むろ液を回収し、スピンカラム (Vivaspin 20; Sartorius Stedim Biotech S.A.) を用いた限外濾過により濃縮した後、ゲル濾過カラム (Superdex 75 HiLoad 16/60; GE Healthcare Life Sciences) とリン酸緩衝生理食塩液 (pH 7.4) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。集めた lacritin 分画は、SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびイムノブロッティングにより、含まれるタンパク質のうち 98%以上が lacritin であると確認されたものを実験に使用した。

##### 1-1-2-3 サル主涙腺腺房細胞の単離培養および分泌涙液タンパク質のサンプリング

サル主涙腺腺房細胞の単離培養は、中嶋らの方法<sup>9)</sup>と同様に、サル主涙腺をコラゲナーゼおよびヒアルロニダーゼ等により分離した細胞から、細胞密度を利用して腺房細胞を

単離し、ラットの collagen I (0.01 mg/cm<sup>2</sup>; BD BioSciences) でコートしたプレート上に  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種した。培養液は、50 µg/ml gentamicin (Life Technologies) を含む DMEM/F12 (Life Technologies) に 10 ng/ml dexamethazone (Sigma-Aldrich)、50 ng/ml epidermal growth factor (EGF, Life Technologies)、10 µg/ml glutathione (Sigma-Aldrich)、 $1 \times$  insulin-transferrin-sodium selenite media supplement (Sigma-Aldrich)、25 µg/ml L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich) および 1 mM putrescine (Sigma-Aldrich) を添加したものを使用した。播種後、細胞が接着して上皮様の形態を示すまで、上記培養液中で約 16 時間培養した後、実験に使用した。非接着細胞を洗浄して除き、接着した腺房細胞は、添加物不含の培養液による 30 分間の前培養に続き、サル涙液から精製した lacritin もしくは陽性対照物質の carbachol (Sigma-Aldrich) で 10 分間刺激した後、培養上清を回収した。培養上清中に分泌した涙液タンパク質を測定するために、剥離して混ざった細胞を遠心して除き、上清を濃縮してから、イムノブロッティングに供した。

涙液タンパク質分泌に細胞外カルシウムが必要かどうかを調べる実験では、上記のカルシウムを含む培養液の代わりに、カルシウム不含の培養液 (EpiLife Medium; Life Technologies) を前培養および刺激の際に使用した。

#### 1-1-2-4 イムノブロッティング

サル主涙腺腺房細胞の培養上清を回収し、熱変性させたタンパク質を、4-12% Bis-Tris Gel および MES SDS Running Buffer (いずれも NuPAGE; Life Technologies) にて分離し、ゲルから polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Millipore) にタンパク質を電気泳動転写した。その後、PVDF 膜を 0.5% スkim ミルクでブロッキングし、一次抗体液と 4℃ で一晩反応させた。一次抗体は、抗 lipocalin 抗体 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) もしくは抗 lactoferrin 抗体 (1:5000; Sigma-Aldrich) を用いて、1% bovine serum albumin (BSA) および 0.05% Tween 20 を含むトリス緩衝生理食塩液に希釈した。続いて、horseradish peroxidase 標識二次抗体と室温で 1 時間反応させた後に、化学発光検出した。

#### 1-1-2-5 細胞内カルシウムの測定

単離培養した主涙腺腺房細胞を、カルシウム結合蛍光試薬 (Calcium-4; Molecular Devices) と 37℃ で 1 時間インキュベートした。蛍光強度は、マイクロプレートリーダー (Flexstation 3; Molecular Devices) を用いて 1.5 秒間隔で 3 分間測定した。初期バックグラウンド値を 20 秒間測定した後に、carbachol もしくは lacritin を加え、蛍光強度の変

化を測定した。

#### 1-1-2-6 統計解析

得られたデータは、統計解析ソフト(JMP 8.0.1 もしくは 10.0.0; SAS Institute Japan)を使用して Dunnett 検定もしくは Student の t 検定した。有意水準は 5%に設定した。

#### 1-1-3 結果

サル主涙腺から単離培養した腺房細胞をサル涙液から精製した lacritin で刺激した結果、涙液タンパク質 lipocalin および lactoferrin の分泌量が、lacritin の濃度依存的に増加する傾向が見られ、1  $\mu$ M では基剤群に対して有意な分泌促進が認められた(図 1)。その効果は、涙液タンパク質分泌作用を有することで知られている carbachol とほぼ同程度であった。そこで、以降の実験には 1  $\mu$ M の lacritin もしくは carbachol を用いることにした。

次に、lacritin による涙液タンパク質分泌作用のメカニズムを調べるために、神経伝達物質アセチルコリンのアナログである carbachol と比較した。サル主涙腺から単離した腺房細胞を carbachol で刺激すると、細胞内カルシウム濃度の一過性の上昇が観察されたが、一方の lacritin 添加後には全く変化が認められなかった(図 2A)。また、lacritin と carbachol との混合液で刺激すると、それぞれ単独で刺激したときと比べて、lipocalin の分泌量が相加的に増加した(図 2B)。しかし、細胞内カルシウム濃度には、carbachol に lacritin を足して刺激しても相加的な変化は認められなかったことから、lacritin による涙液タンパク質分泌作用は carbachol とは異なりカルシウム非依存的であると示唆された。同様の結果は、カルシウム不含の培養液を用いた実験でも確認でき、carbachol による lipocalin 分泌作用が細胞外カルシウムイオン非存在下では消失したのに対して、lacritin による分泌促進は細胞外カルシウムの有無に関わらず同等に認められた(図 2C)。

#### 1-1-4 考察

自身も涙液タンパク質の一つである lacritin は、オートクラインに作用して、サル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌を促すことが分かった。Lacritin による涙液タンパク質分泌作用の詳しいメカニズムはまだ解明されていないものの、carbachol とは異なり、細胞内にカルシウムイオン流入を必要とせず、また carbachol との混合刺激により涙液タンパク質分泌作用が相加的に増加したことから、lacritin は carbachol とは異なる細胞内経路を利用している可能性が示唆された。



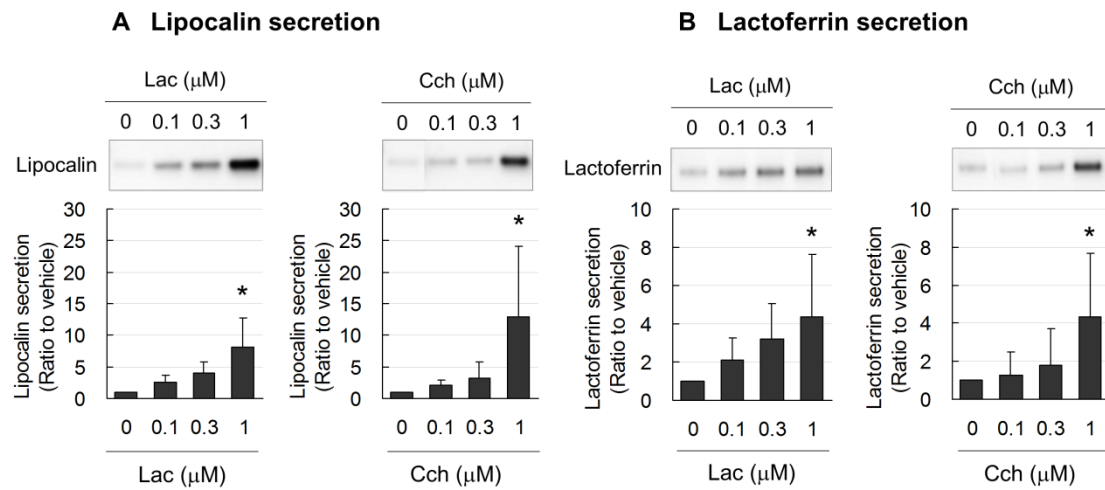


図 1. 培養サル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌

代表的なイムノブロットの写真およびバンド密度の測定結果を示す。Lacritin (Lac) および carbachol (Cch) は、いずれも lipocalin (A) および lactoferrin (B) の分泌を促進し、濃度依存の傾向が認められた。各値は 4 例の平均値±標準偏差を示す。\*  $p < 0.05$  (0  $\mu\text{M}$  に対する Dunnett 検定)。

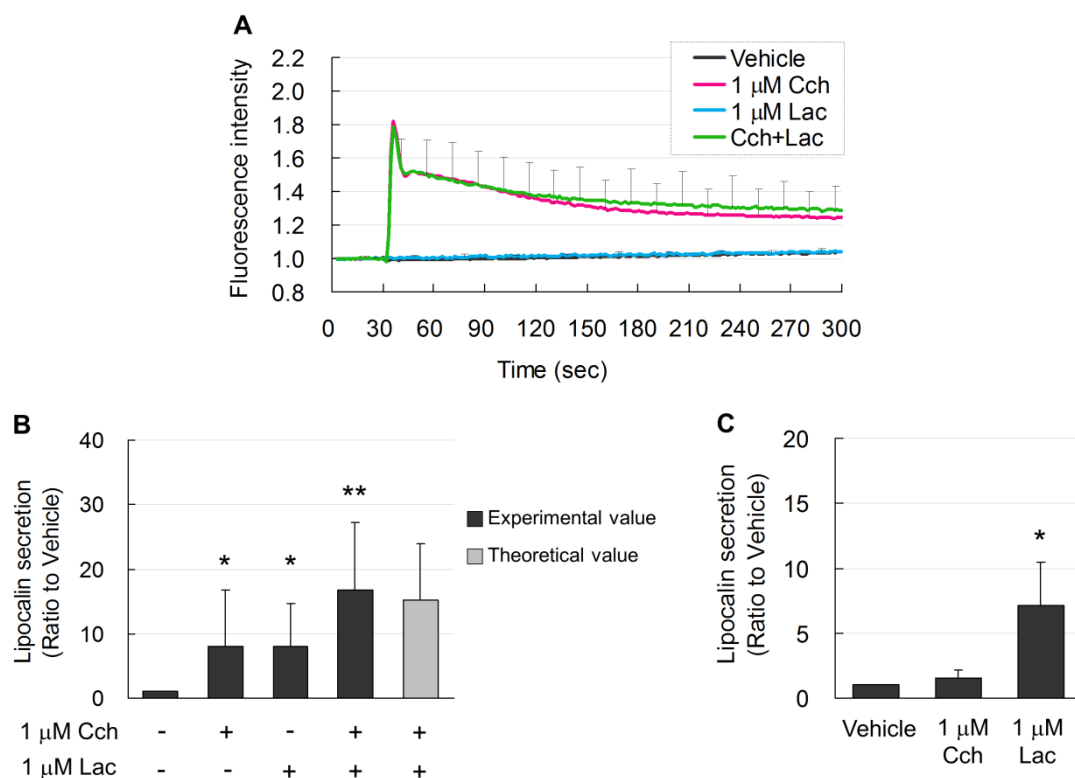


図 2. 培養サル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌と細胞内カルシウムの関与

(A) Carbachol (Cch) (赤線) で刺激すると細胞内カルシウム濃度 (蛍光強度) の上昇が認められたが、lacritin (Lac) (青線) 刺激では細胞内カルシウムは上昇せず、基剤 (Vehicle) (黒線) と同等のレベルであった。Cch と Lac とで混合刺激 (Cch+Lac) (緑線) しても、Cch 単独刺激と比較して細胞内カルシウムの更なる上昇は認められなかった。

(B) Lipocalin 分泌は、Lac 単独では Cch と同程度であったが、両者の混合刺激により、相加的に増加した。薄いグレーのバーは、Cch および Lac それぞれによる分泌量を加算した計算値を示す。各値は 6 例の平均値  $\pm$  標準偏差を示す。\*  $p < 0.05$  (基剤群に対する Student の  $t$  検定)、\*\*  $p < 0.05$  (Cch および Lac 単独刺激群に対する Student の  $t$  検定)。

(C) カルシウム不含培養液を用いると、Cch 刺激による lipocalin 分泌は消失したが、Lac 刺激による分泌は細胞外カルシウム非存在下でも認められた。各値は 3 例の平均値  $\pm$  標準偏差を示す。\*  $p < 0.05$  (基剤群に対する Dunnett 検定)。

## 第1章 — 第2節

### サル主涙腺腺房細胞の培養系における炎症モデルの作成

#### 1-2-1 目的

サル主涙腺から単離培養した腺房細胞を用いて、ドライアイの慢性炎症を模した *in vitro* モデルを作成するために、患者の涙液や涙腺で増加が報告されている炎症性サイトカインを細胞に暴露させて、細胞が障害されるかどうかを調べた。

#### 1-2-2 実験材料および方法

##### 1-2-2-1 サル主涙腺腺房細胞における炎症モデルの確立

1-1-2-3 項と同様に準備したサル主涙腺腺房細胞の培養液に、tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ; R&D Systems) および interferon gamma (IFN- $\gamma$ ; R&D Systems) を加えて、さらに 1、2、もしくは 3 日間培養した。眼表面の炎症によるダメージと比較するために、ヒト角膜上皮細胞 (HCE-T 細胞; 佐々木香る先生 (出田眼科病院) 寄託の細胞株) を  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、16 時間培養した後に、TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  で同様に処理した。

サイトカインと一緒に各細胞をインキュベーション後、細胞障害の指標として、培養上清中に漏出した lactate dehydrogenase (LDH) を LDH Cytotoxicity Detection Kit (Takara Bio) を用いて測定した。細胞内に及ぼすサイトカインの影響を調べるために、細胞を細胞溶解バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 mM sodium orthovanadate、1 mM dithiothreitol、protease inhibitor (complete Mini-EDTA free; Roche Diagnostics) および phosphatase inhibitor cocktail I and II (EMD Chemicals)) 中に回収した。超音波破碎した後に、遠心分離 (16,000 $\times$ g、10 分間) して得た上清を、1-1-2-4 項と同様にイムノブロッティングに供した。細胞溶解液のタンパク質濃度は、BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific) により測定し、各サンプルの総タンパク質量が一定になるように泳動した。イムノブロッティングの一次抗体には、抗 phosphorylated signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) 抗体 (1:1000; Cell Signaling Technology)、抗 STAT1 抗体 (1:1000; Cell Signaling Technology)、抗 I $\kappa$ B 抗体 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) もしくは抗  $\beta$ -actin 抗体 (1:1000; Sigma-Aldrich) を使用した。

##### 1-2-2-2 免疫細胞化学

培養した細胞を-20℃に冷却した100%メタノールで3分間固定した。固定後の細胞を、1% BSA および0.1% Triton X-100 と室温で15分間反応させることにより、ブロッッキングおよび細胞透過処理を行った後に、一次抗体液と4℃で終夜反応させた。一次抗体液は、抗 lacritin 抗体<sup>9)</sup> (1:200)、抗 lipocalin 抗体 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) もしくは抗 lactoferrin 抗体 (1:5000; Sigma-Aldrich) を1% BSA を含むトリス緩衝生理食塩液に希釈したものをを用いた。続いて、Alexa Fluor 488 標識二次抗体 (1:1000; Life Technologies) および 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, 1:1000; Life Technologies) と室温で1時間反応させた後に、免疫染色された細胞を倒立蛍光顕微鏡 (Axiovert 200 および AxioCam MRc5; Carl Zeiss Vision) で観察、撮影した。撮影した画像は、画像解析ソフト ImageJ 1.4.3.67 (National Institutes of Health) および GIMP 2.6.11 (ImageJ software) を用いて編集した。

### 1-2-3 結果

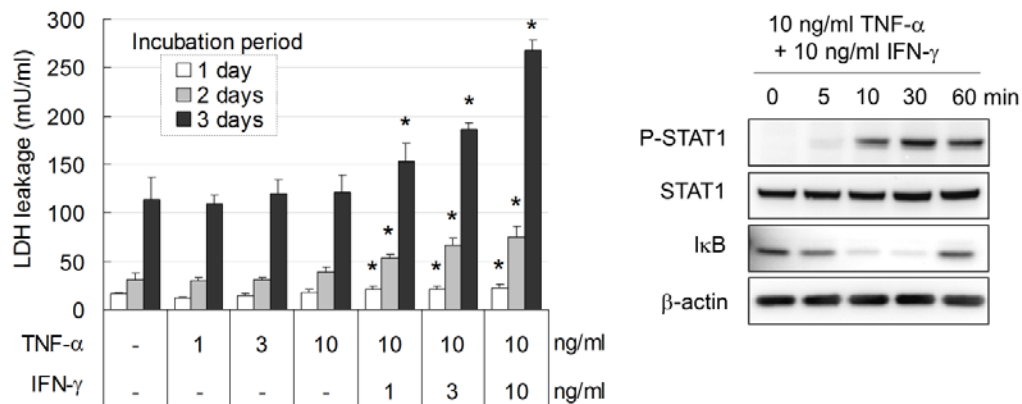
まず、HCE-T 細胞を用いて、サイトカインの暴露条件を検討した。HCE-T 細胞の培養液に TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  を加えて培養すると、サイトカインの濃度および暴露時間に比例して LDH の細胞外漏出量が増加し、細胞障害が認められた (図 3A 左)。このとき、炎症に関連する細胞内因子の変化も調べたところ、IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  それぞれの下流シグナルとして知られる STAT-1 のリン酸化および I $\kappa$ B の一時的な消失を確認した (図 3A 右)。一方、サル主涙腺腺房細胞に、HCE-T 細胞で最も強い細胞障害が認められた 10 ng/ml 同士の両サイトカインを暴露した結果、STAT-1 および I $\kappa$ B の細胞内シグナルの変化は HCE-T 細胞と同様に確認できたものの、LDH 漏出量は増加しなかった (図 3B)。

サル主涙腺腺房細胞は、培養して接着すると、上皮様の形態を示し、細胞内に分泌顆粒が見えるが、サイトカイン処理後も、細胞の形態に変化は認められず、細胞内の涙液タンパク質 lacritin、lactoferrin および lipocalin の局在および含有量にも変化はなかった (図 4)。

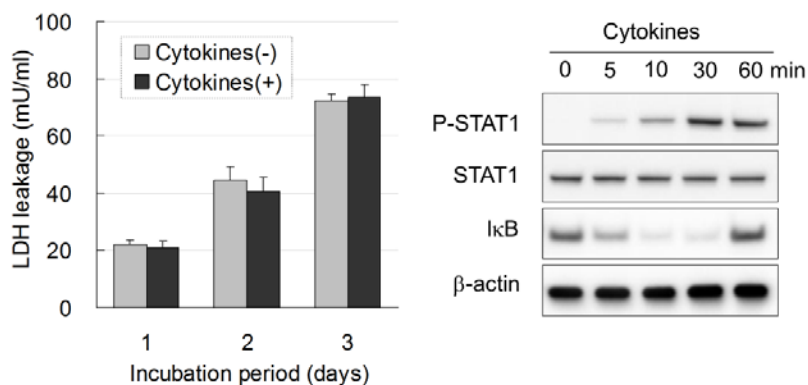
### 1-2-4 考察

サル主涙腺腺房細胞を炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  で処理することにより、細胞内のシグナルは観察されたが、ヒト角膜上皮細胞に障害を及ぼしたのと同濃度を用いても、主涙腺腺房細胞には細胞障害が認められなかった。このことから、サル主涙腺腺房細胞はヒト角膜上皮細胞に比べて、炎症性サイトカインが作用しても障害を受けにくいと考えられた。また、サイトカイン処理による細胞形体や細胞内の涙液タンパク質への影響も特に認められなかった。

### A HCE-T cells



### B Acinar cells



**図 3. 炎症性サイトカインの暴露による細胞障害および細胞内シグナルへの影響**

(A) HCE-T 細胞からの LDH 漏出量は、TNF- $\alpha$  単独処理では 10 ng/ml まで変化が認められなかったが、TNF- $\alpha$  に加えて IFN- $\gamma$  で処理すると、有意な増加が認められた。各値は 5 例の平均値  $\pm$  標準偏差を示す。\*  $p < 0.05$  (インキュベーション時間毎の無処置群に対する Dunnett 検定)。(右) 細胞内シグナルをイムノブロッティングで検出したところ、各 10 ng/ml の TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  との組み合わせにより、STAT1 のリン酸化および I $\kappa$ B の消失が確認できた。(B) サル主涙腺腺房細胞では、高濃度 (10 ng/ml) の TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  で処理しても LDH 漏出は増加しなかった。各値は 3 例の平均値  $\pm$  標準偏差を示す。(右) 各 10 ng/ml の TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  との混合処理により、HCE-T 細胞と同様に STAT1 のリン酸化および I $\kappa$ B の消失が確認できた。

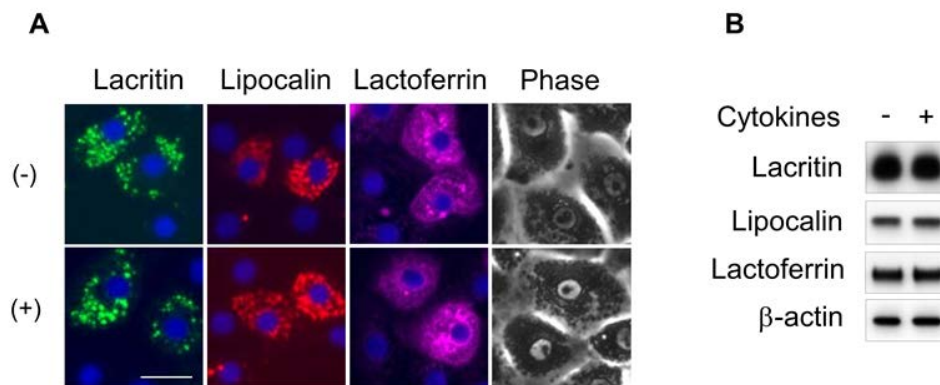


図 4. サイトカイン暴露による培養サル主涙腺腺房細胞内の涙液タンパク質への影響

(A) Lacritin (緑)、lipocalin (赤) および lactoferrin (赤紫) の免疫染色像と位相差像を示す。各 10 ng/ml の TNF- $\alpha$ および IFN- $\gamma$ を 1 日間暴露したが、涙液タンパク質の細胞内分布には、サイトカイン処理の有無による違いは見られなかった。(B) 細胞溶解液のイムノブロットにおいて、lacritin、lipocalin および lactoferrin いずれの発現量にも、サイトカイン処理による変化は認められなかった。内標準物質として $\beta$ -actin を検出した。

## 第1章 — 第3節

### サイトカイン処理したサル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌作用

#### 1-3-1 目的

第2節で作成したサル主涙腺腺房細胞の炎症モデルを用いて、carbachol および lacritin による涙液タンパク質分泌の機能面に変化があるかどうかを調べた。

#### 1-3-2 実験材料および方法

1-1-2-3 項と同様に準備したサル主涙腺腺房細胞に、10 ng/ml TNF- $\alpha$ および 10 ng/ml IFN- $\gamma$ を加えてさらに1日間培養した後、1-1-2-3 項と同様に lacritin もしくは carbachol で刺激して、培養上清に分泌した涙液タンパク質 lipocalin をイムノブロッティング(1-1-2-4 項)により検出した。また、1-1-2-5 項と同様の手順で、細胞内カルシウムの動態も測定した。

#### 1-3-3 結果

サイトカイン処理していない通常の細胞では、lacritin と carbachol による lipocalin 分泌作用が同等に認められた。ところが、サイトカイン処理した細胞では、carbachol 刺激による lipocalin 分泌が見られなくなり(図 5A)、このとき、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇も、サイトカイン処理により抑制されていた(図 5B)。一方、lacritin で刺激した場合には、サイトカイン処理した細胞からも通常の細胞と同様に lipocalin 分泌が認められ、その効果は同条件の基剤群に対して有意であった(図 5A)。

#### 1-3-4 考察

サル主涙腺腺房細胞を 10 ng/ml の TNF- $\alpha$ および IFN- $\gamma$ で処理することにより、神経伝達物質アセチルコリンのアナログである carbachol が作用し難くなり、涙液タンパク質分泌の機能低下が認められた。一方 lacritin は、サイトカイン処理の有無に関わらず lipocalin 分泌を促進したことから、炎症状態で神経伝達物質による分泌機能が低下したドライアイの涙腺にも lacritin は作用することが示唆された。

涙腺からの涙液タンパク質分泌は、神経終末から放出される神経伝達物質によって促進する。しかし、炎症状態では、神経伝達物質の放出ならびに涙液タンパク質分泌が抑制され<sup>6,18)</sup>、ドライアイに至ると考えられている。実際に、炎症性の眼疾患では、涙液中の lacritin 前駆体の減少が報告されている<sup>12)</sup>。炎症状態下でも涙液タンパク質分泌を促す作用がある

lacritin を補充することは、炎症に伴い涙液分泌機能が低下したドライアイの治療に有用であると考えられた。

本試験では、lacritinの涙液タンパク質分泌作用に焦点を当てたが、lacritinには細胞死抑制効果の報告もあり、リポポリサッカライド誘発の角膜上皮細胞死を抑制した際には、そのメカニズムとしてcyclooxygenase-2 の関与が示された<sup>19)</sup>。ドライアイにおいて涙腺や角膜が障害される原因は、浸潤してきた免疫細胞や増加した炎症性サイトカインによって細胞死が引き起こされるためと言われているが、細胞死の分子メカニズムは未だ完全に解明されていない<sup>20)</sup>。一方、動物モデルや他の腺細胞の研究から、細胞障害のメカニズムとして、ドライアイでも増加するIFN- $\gamma$ やTNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインによって誘導されるnitric oxide synthase等の酸化ストレスやcyclooxygenase-2 の関与が示唆されている<sup>21,22)</sup>。Lacritinがドライアイの炎症から細胞を守るかどうか、調べる価値は十分あると考えられ、もし証明できれば、涙液分泌作用に付加価値となるだけでなく、重症化予防や老化に伴い増加するドライアイのコントロールにつながるかもしれない。



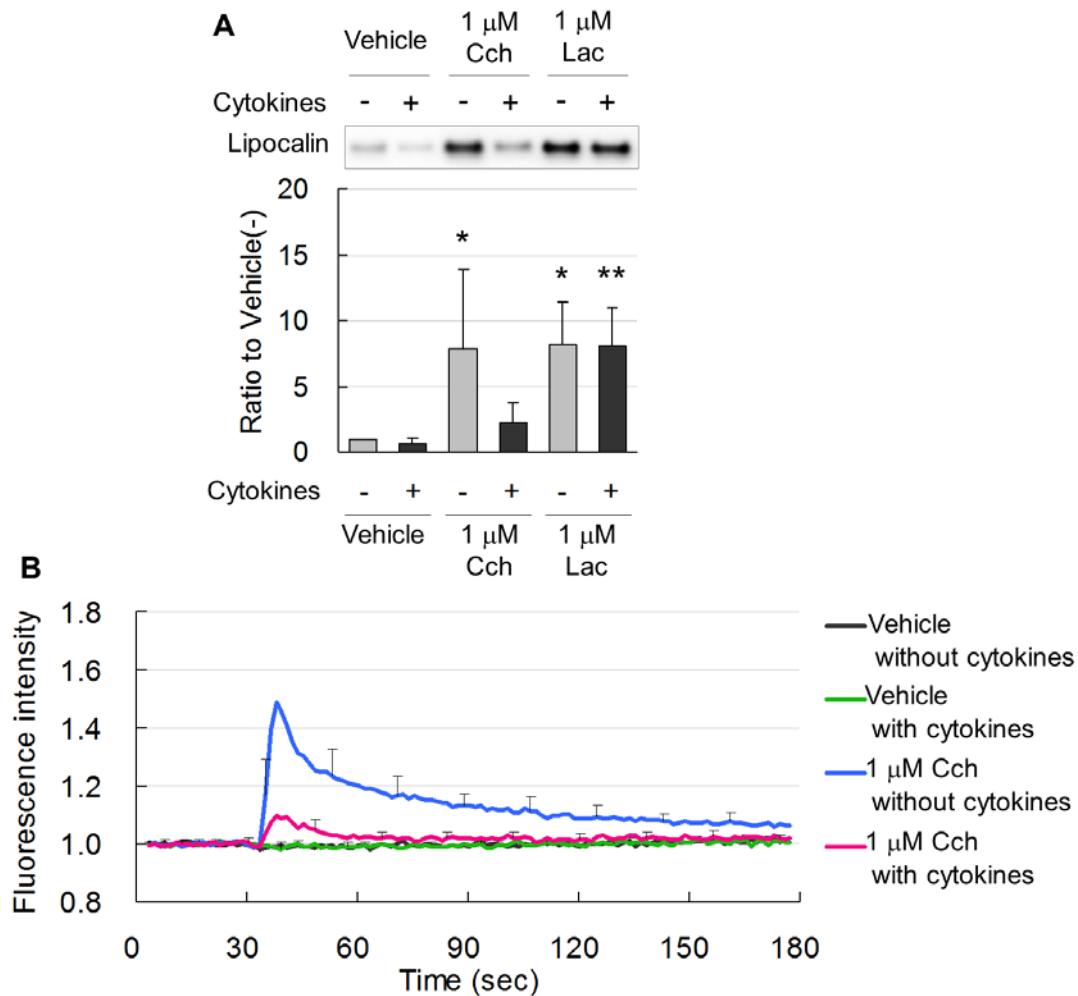


図 5. 炎症性サイトカイン処理による涙液タンパク質分泌機能に対する影響

(A) 代表的なイムノブロットの写真およびバンド密度の測定結果を示す。サイトカイン処理していない (Cytokines -) 通常のサル主涙腺腺房細胞では、lacritin (Lac) および carbachol (Cch) は同程度の lipocalin 分泌促進を示した。一方、各 10 ng/ml 同士の TNF- $\alpha$  兼 IFN- $\gamma$  で 1 日間処理した (Cytokines +) 細胞からは、Cch 刺激による分泌促進効果が見られなくなった。Lac 刺激による分泌促進は、サイトカイン処理による影響を受けなかった。各値は 6 例の平均値  $\pm$  標準偏差を示す。\*  $p < 0.05$  (通常細胞における基剤群に対する Dunnett 検定)、\*\* $p < 0.05$  (サイトカイン処理した細胞における基剤群に対する Dunnett 検定)。(B) サイトカイン無処理の通常細胞では、Cch 刺激により細胞内カルシウムの上昇が認められたが (青線)、サイトカイン処理によって細胞内カルシウム濃度の変化が抑制された (赤線)。

## 小括

- 本章では、主涙腺からの涙液タンパク質分泌を増加させることにより、涙液の質を改善して、ドライアイを治療することを目指して、lacritin によるサル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌作用およびメカニズムを調べた。
- サル涙液から精製した lacritin は、サル主涙腺腺房細胞から涙液タンパク質の分泌を促進させた。
- そのメカニズムは、carbachol と異なり、カルシウム非依存的であった。
- 主涙腺腺房細胞を炎症性サイトカイン  $\text{TNF-}\alpha$  および  $\text{IFN-}\gamma$  で処理することにより、ドライアイを模した実験的な炎症モデルを作成した。
- この炎症モデルでは、carbachol による涙液タンパク質分泌作用が減弱したが、一方、lacritin はサイトカイン処理した細胞からも変わらずに涙液タンパク質分泌を促した。
- 神経伝達物質とは異なり、炎症状態下でも涙液タンパク質分泌促進効果を示す lacritin は、炎症により涙液分泌機能が低下したドライアイの治療に有用であると考えられた。

## 第2章 PACAPによる三叉神経の軸索伸長作用

本章では、神経の軸索伸長を促進する候補物質として、PACAPに注目した。

涙液の分泌は、自律神経以外にも、角膜知覚を司る三叉神経による調節も受けている。角膜には、三叉神経の神経線維が高密度に存在するため、角膜知覚は非常に敏感であり、知覚刺激に伴う涙液の反射分泌は、正常な涙液層の維持に欠かせない。近年、近視の治療にレーザー角膜切削形成術 (laser-assisted in-situ keratomileusis; LASIK) を受ける患者が急増しているが、術後にドライアイを発症することがあり問題になっている<sup>23,24</sup>。LASIKでは角膜フラップを作成する際に神経が切断されるが、術直後には角膜内の神経線維束が90%消滅し、その再生には3-6か月かかると言われている<sup>25</sup>。角膜知覚が低下すると、涙腺からの水層の反射分泌が減少するだけでなく、瞬目回数の減少に伴い、脂腺であるマイボーム腺からの油分の分泌も減少し、さらに涙液層の伸展機会も減少するため、涙液層が乱れて、ドライアイを発症もしくは重症化すると考えられている。しかし、現在のところ、角膜の神経再生をターゲットにしたドライアイ治療薬は未だ開発されていない。

以前に、ウサギのLASIKモデルにPACAPを点眼すると、切断された角膜内の三叉神経の伸長が早まり、知覚回復が促進したことが確認されており<sup>26</sup>、PACAPは角膜の神経再生によるドライアイ治療薬の候補になり得ると考えていた。PACAPはグルカゴン・セクレチンファミリーに属す神経ペプチドで、血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal peptide; VIP) とは68%の高い相同性を示す。PACAP/VIPの受容体は、3種類の遺伝子が同定されているが<sup>27</sup>、神経伸長作用がどの受容体を介した作用かは、未だ明らかにされていなかった。そこで、本試験では、よりヒトに近いサルの三叉神経節細胞を培養し、PACAPによる神経伸長作用とそのメカニズムを調べることにした。また、PACAPによる涙液タンパク質分泌作用についても、サル主涙腺腺房細胞を用いて調べた。

## 第2章 — 第1節

### PACAP によるサル三叉神経節細胞からの軸索伸長効果

#### 2-1-1 目的

サル三叉神経節から分離した細胞を培養し、PACAP が神経細胞からの軸索伸長を促進するかどうかを検討した。

#### 2-1-2 実験材料および方法

##### 2-1-2-1 実験動物

三叉神経節組織は、Oregon National Primate Research Center のアカゲザル (*Macaca mulatta*) から、本研究とは別の目的で解剖された際に入手した。動物の飼育および取扱いは、眼科・視覚研究における動物実験指針 (ARVO Statement for the use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and the Guiding Principles in the Care and Use of Animals) に従った。

##### 2-1-2-2 サル三叉神経節細胞の分離培養および軸索伸長

Geenenらのブタ三叉神経節細胞の培養方法<sup>28)</sup>を応用した。一頭のサルから採取した三叉神経節を4分割し、0.2% collagenase A (Roche Applied Science) で酵素処理することにより細胞を分離した。30分毎に酵素溶液を回収し、遠心 (200×g、5分) により分離した細胞と酵素溶液とに分け、酵素溶液は組織をさらに酵素処理するのに再利用した。この操作を三叉神経節組織が完全に消化されるまで繰り返し、集めた全ての分離細胞を培養液 (Neurobasal Mediumに2% B-27 および2 mM L-glutamine (いずれもLife Technologies) を添加) に懸濁し、ポリDリシン/ラミニンコートした24ウェルプレート (BD Bioscience) 上に神経細胞密度が2500 cells/cm<sup>2</sup>になるように播種した。一頭のサルから採取した2つの三叉神経節組織からは、およそ $2.5 \times 10^5$ 個の細胞が分離できた。播種後1日培養した後に、非接着細胞を洗浄して除き、新しい培養液に交換し、接着細胞を実験に使用した。

神経軸索の伸長誘導には、PACAP分子のうち生物活性のあるN末端から27アミノ酸残基 (PACAP-27; EMD Chemicals)<sup>29)</sup>を、比較対照としてVIP (EMD Chemicals) もしくは陽性対照としてnerve growth factor (NGF; Sigma-Aldrich) を用いた。軸索伸長の誘導物質を添加して2日間培養した後に、細胞を10%ホルマリン含有phosphate buffered saline (PBS) で室温30分間固定し、免疫細胞化学により染色した。

### 2-1-2-3 免疫組織化学

アカゲザルから採取した三叉神経節組織を 10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、4  $\mu$ m の厚さに薄切した。切片を、10% fetal bovine serum (FBS) を含む PBS で室温 30 分間ブロッキングした後、一次抗体と室温で 2 時間反応させた。一次抗体には、抗 neurofilament (NF) 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) および抗 PAC1 受容体抗体 (Abcam) を使用した。切片を PBS で洗浄した後、Alexa Fluor 488 もしくは 546 標識二次抗体 (Life Technologies) および核染色用の DAPI と室温で 1 時間反応させた。全ての一次抗体および二次抗体は 1:1000 希釈して使用した。免疫染色された組織の蛍光像は、倒立顕微鏡 (Axiovert 200、AxioCam MRc5 および ApoTome Slider; Carl Zeiss Vision) で観察、撮影した。撮影した画像は、画像解析ソフト ImageJ 1.42 (National Institutes of Health) および Adobe Photoshop (Adobe Systems) を用いて編集した。

### 2-1-2-4 免疫細胞化学

固定後の細胞を、10% FBS を含む PBS で室温 30 分間ブロッキングした。細胞の蛍光染色は 2-1-2-3 項と同様に実施した。免疫染色された細胞は、共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP laser scanning confocal microscope および Leica IRBE; Leica Microsystems) で観察した。撮影した画像は、ImageJ および Adobe Photoshop を用いて編集した。

### 2-1-2-5 細胞数の計測および統計解析

神経軸索の伸長を定量するために、1 ウェルにつき 10-17 視野から細胞を計測した。NF 陽性の細胞を神経細胞として認識し、そこから伸びた軸索長が細胞体の直径より 2 倍以上ある細胞の全神経細胞数に対する割合を算出した。

データは、統計解析ソフト JMP 8.0.1 (SAS Institute) を用いて Dunnett 検定した。有意水準は 5%に設定した。

## 2-1-3 結果

### 2-1-3-1 サル三叉神経節の分離培養

サル三叉神経節から分離培養した細胞を免疫染色して確認すると、組織中での構造と類似して、NF 陽性の神経細胞体を GFAP 陽性のシュワン細胞が取り巻くように存在し、培養 3 日目には細胞体から同じく NF 陽性の軸索が伸びる様子が確認できた (図 6B)。こ

の分離培養には、NF、GFAP および fibroblast いずれにも陰性の同定されない細胞も含まれていた（データ未掲載）。培養細胞の構成は、三叉神経節細胞が 3.5%、シュワン細胞が 76.1%、未同定の細胞が 20.4%であった。

#### 2-1-3-2 PACAP-27 による神経軸索の伸長促進

PACAP-27 および陽性対照物質の NGF は、サル三叉神経節細胞からの軸索伸長を促進した。PACAP-27 の刺激により軸索を伸ばす細胞の割合は、PACAP の濃度に比例して増加し、 $10^{-7}$  M 以上で基剤群に対して有意な効果が認められた（図 7）。その効果を VIP と比較すると、PACAP の  $10^{-8}$  M と VIP の  $10^{-6}$  M がほぼ等しく、VIP が PACAP と同等の効果を示すには 100 倍高い濃度が必要であった。

PACAPによる神経軸索伸長効果は、マウス下垂体神経細胞では  $10^{-10}$  M以上で<sup>30)</sup>、ヒト神経芽細胞腫株SH-SY5Y細胞では  $10^{-8}$  M以上で<sup>31)</sup>、それぞれ報告されており、これらの既報における有効濃度と比べると、今回、サル三叉神経節細胞で効果が認められた濃度は高かったが、ウサギ三叉神経節細胞やラット副腎褐色細胞腫株PC12 細胞では同様に  $10^{-7}$  M以上の高濃度で効果が認められており<sup>26,32)</sup>、これら有効濃度の違いは、用いた細胞や実験手技の差異によって生じた可能性が考えられた。

#### 2-1-4 考察

サル三叉神経節細胞の培養系を新規に確立し、3 日間培養することで、角膜で見られるような神経軸索の伸長を観察することができた。サルの材料を用いたことで、ヒトへの高い外挿性が期待できることから、本培養系は有用な実験ツールと考えられる。本培養系において、PACAP-27 による軸索伸長効果が確認できたことから、次節ではそのメカニズムを調べていく。

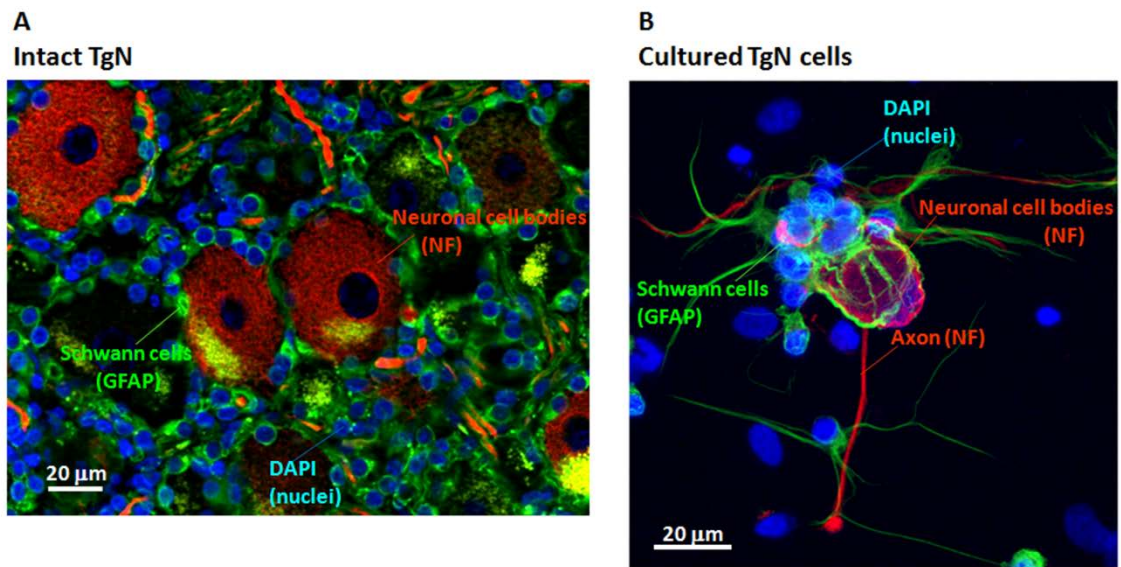


図 6. サル三叉神経節の組織および分離培養細胞の免疫染色像

(A) 新鮮なサル三叉神経節組織を免疫染色した。GFAP に対する抗体で染色されたシュワン細胞（緑）が、NF に対する抗体で染色された神経節細胞（赤）を取り囲むように存在する様子が観察された。核（青）は DAPI で染色した。(B) サル三叉神経節から分離後 3 日間培養した細胞を同様に三重に免疫染色した。

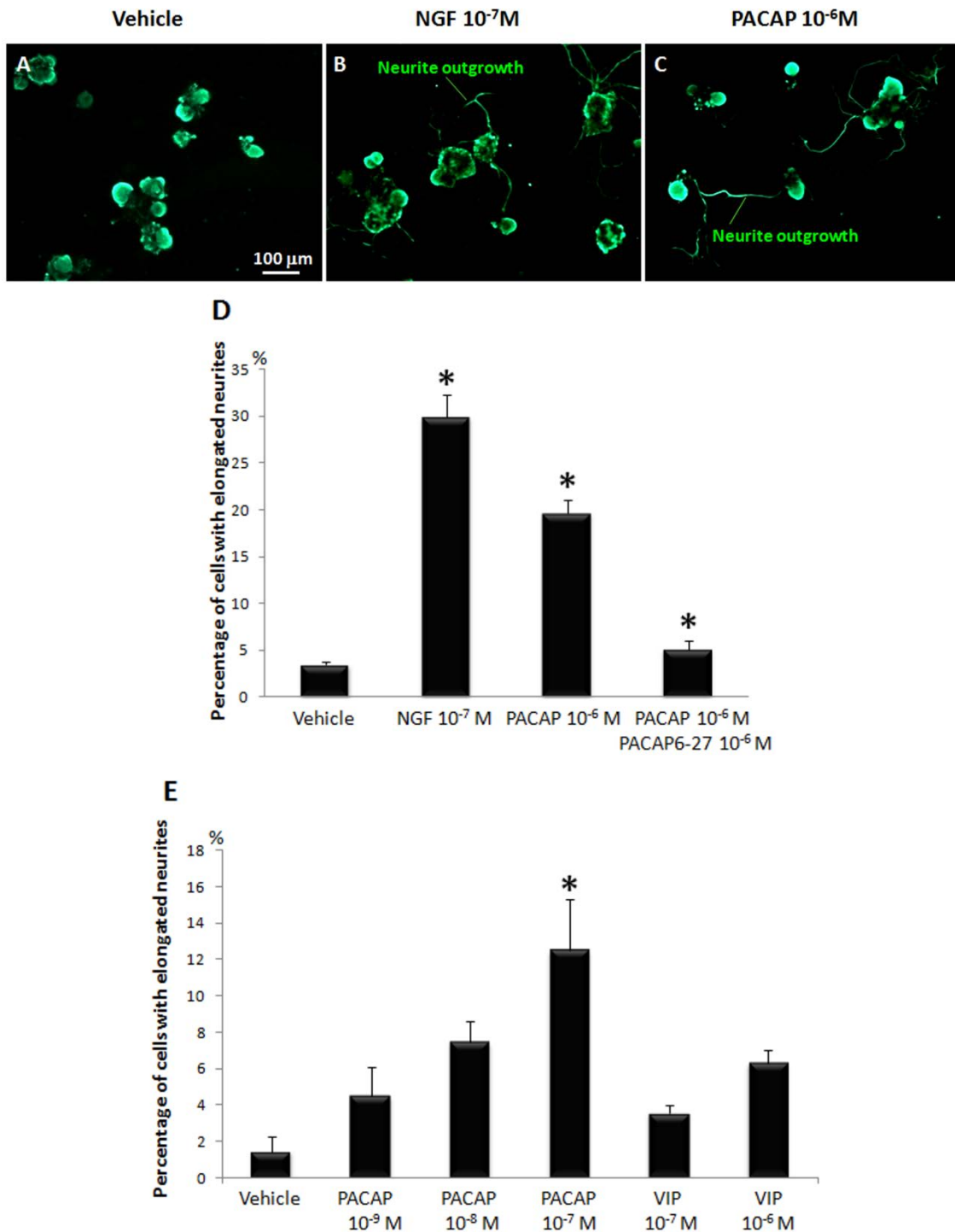


図 7. PACAP-27 による培養サル三叉神経節細胞からの軸索伸長作用

(A-C) 神経節細胞を NF に対する抗体で緑に免疫染色した。 $10^{-7}$  M NGF (B) および  $10^{-6}$  M PACAP-27 (C) で刺激した神経節細胞からは、基剤群 (A) に比べて顕著な軸索伸長が観察された。(D) NF 陽性の神経節細胞のうち、軸索伸長が認められた細胞数の割



合をグラフ化した。各値は 9 例の平均値±標準誤差を示す。\*  $p<0.05$ （基剤群に対する NGF もしくは PACAP-27 単独刺激による軸索伸長作用、もしくは PACAP-27 単独刺激に対する阻害剤 PACAP6-27 による阻害作用を Dunnett 検定）。(E) PACAP-27 もしくは比較対照 VIP で刺激すると、それぞれ濃度が上がるにつれて軸索伸長が認められた細胞数の割合も増加した。各値は 3 例の平均値±標準誤差を示す。\*  $p<0.05$ （基剤群に対する Dunnett 検定）。

## 第2章 — 第2節

### 受容体発現と神経軸索伸長のメカニズム

#### 2-2-1 目的

PACAPによる神経軸索伸長作用のメカニズムを調べるために、三叉神経節細胞における受容体発現および細胞内シグナルを調べた。さらに、PACAPによる軸索伸長作用のメカニズムを遺伝子レベルでも確認するために、PACAPおよび神経軸索伸長の両方に関連する遺伝子follistatin<sup>33)</sup>の発現変化を調べた。

#### 2-2-2 実験材料および方法

##### 2-2-2-1 三叉神経節細胞の培養および細胞内シグナルの確認

2-1-2-2 項と同様にサル三叉神経節細胞を培養し、PACAP-27 による神経軸索の伸長を評価した。軸索伸長のメカニズムを調べるために以下の阻害剤を、PACAP-27 もしくはVIPを作用させる1時間前から添加した。PACAPのN末端配列はPACAP受容体を刺激し、C末端配列は受容体への結合に関与すると言われており、N末端の5アミノ酸が欠落したPACAP6-27はPACAP-27によるadenylate cyclase (AC) 活性化を阻害することが報告されている<sup>34,35)</sup>。そこで、PACAP-27の阻害剤としてPACAP-6-27 (AnaSpec) を使用した。PACAP-27の下流の細胞内シグナルを調べるために、phospholipase C (PLC) 阻害剤であるU73122 (Sigma-Aldrich) およびAC阻害剤である2',3'-dideoxyadenosine (ddA; Sigma-Aldrich) を使用した。

##### 2-2-2-2 RNA抽出および逆転写

PACAP-27 もしくはVIPで刺激した細胞から、TRIzol (Life Technologies) を用いてRNAを抽出した。RNAは、75%エタノールで沈殿させた後、RNEasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。RNAの品質を2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) にて確認し、RNA定量試薬 (RiboGreen; Life Technologies) を用いてRNA濃度を測定した。RNA (50 ng/μl) を6 U/μl SuperScript II Reverse Transcriptase、0.25 U/μl SUPERase-In、12.5 ng/μl ランダムプライマーおよび0.5 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs; Life Technologies) と逆転写反応させて、cDNAを作成した。

##### 2-2-2-3 定量的 polymerase chain reaction (PCR)

PACAPの受容体分布を調べるために、定量的PCRを実施した。表1に示したアカゲ

ザルの PAC1、VPAC1 および VPAC2 に対するプライマーとプローブは、Custom TaqMan Gene Expression Assay (Life Technologies) を用いて設計した。また、関連遺伝子の発現変化を調べるために、follistatin (Rh01121161\_m1) のプライマーとプローブも同様に準備した。全ての PCR 反応液は、50 ng の cDNA、250 nM のプローブ、900 nM のプライマーおよび 1×PCR Master Mix (Life Technologies) を混合して、合計 20  $\mu$ l に調製した。PCR 条件は、最初に 50°C 2 分間および 95°C 10 分間のインキュベーションにより uracil DNA glycosylase (UDG) を活性化させた後に、95°C 15 秒間および 60°C 1 分間の増幅反応を 40 サイクル実施した。生成物の蛍光強度は StepOnePlus (Life Technologies) を用いてモニターした。

各受容体遺伝子の発現量は、内部標準遺伝子として測定した glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) および hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) の発現量により補正し、検量線を元にコピー数で算出した。各受容体遺伝子の検出限界は、PAC1 が 9 コピー、VPAC1 が 232 コピー、VPAC2 が 343 コピーであった。Follistatin の定量には、相対的な  $\Delta\Delta G$  の発現解析を用いた。転写レベルは検出限界以上であり、GAPDH および HPRT1 の平均発現量により補正した。

表1. 定量的PCRのプライマー

Genes	Primers (5'-3')
<i>PAC1</i>	F: GTGGCTGTTCTCTACTGTTTTCTGA R: GCTTCGCCATTTTCGCTTGATC Probe: TCCGCTTGACCTCGCC
<i>VPAC1</i>	F: CCCCTCATCTTCAAGCTCTTCTC R: CAGGTGTGTCCAACCTTCGT Probe: CACATTGCGGCCTTGAAT
<i>VPAC2</i>	F: CTCTGATGTCTCTTGCAACAGGAA R: CAGGAACAGGTTTCAGATGGATGTAA Probe: CCTCTTCAGGAAGCTGC
<i>GAPDH</i>	F: TGCACCACCAACTGCTTA R: CATGAGTCCTTCCACGATACCAA Probe: CCCTGGCCAAGGTCATCCATGA
<i>HPRT1</i>	F: TCCATTCCCTATGACTGTAGATTTTATCAGACT R: AGTTGAGAGATCATCTCCTCCGATT Probe: CCTGTTGACTGGTCATTACA

### 2-2-3 結果

#### 2-2-3-1 サル三叉神経節細胞における PACAP の受容体発現

まず、サル三叉神経節細胞における受容体の発現を調べるため、PACAP/VIP の 3 種類の受容体 PAC1、VPAC1、VPAC2 の遺伝子発現量を定量的 PCR 法にて比較した。その結果、三叉神経節細胞には、VPAC1 および PAC1 の発現が確認できたが、VPAC2 は検出限界以下であった（図 8A）。VPAC1 が PAC1 より多く発現していたが、その差はわずかに数倍であった。なお、PAC1 受容体の親和性は、VIP よりも PACAP に対して 100～1000 倍高いことが知られている<sup>29)</sup>。一方、VPAC1 および VPAC2 は両者に同等の親和性を示す。

次に、三叉神経節から分離培養した細胞を免疫染色して、PAC1 受容体の分布を調べたところ、神経細胞体（図 8C）およびシュワン細胞（図 8D）共に発現が認められ、さらに神経細胞の軸索上にも分布している様子が確認できた（図 8E）。

#### 2-2-3-2 PACAP による軸索伸長作用の細胞内経路

PACAP-27 によるサル三叉神経節細胞からの軸索伸長効果は、PACAP阻害剤である PACAP6-27 によって阻害されたことから（図 7D）、PACAPが受容体を刺激したことによる作用と考えられた。そこで、PACAPがサル三叉神経節細胞のPAC1 受容体に作用したときの、細胞内経路を調べた。PAC1 受容体の下流には、AC活性化に続いてprotein kinase A（PKA）を活性化する経路と<sup>36)</sup>、PLCの活性化に続いてprotein kinase C（PKC）を活性化する経路があることが知られている<sup>37)</sup>。PACAP-27 によるサル三叉神経細胞からの軸索伸長作用は、PLC阻害剤であるU73122 もしくはAC阻害剤であるddAのいずれによっても阻害された（図 9A）。この結果から、PAC1 受容体が活性化した後、細胞内ではAC/PKA およびPLC/PKCの両経路がクロストークすることにより、軸索伸展を促したと考えられた。

PAC1 受容体には、ラットでは 6 つのスプライスバリエントが同定されており、そのうち 4 つのアイソフォームは、PACAPによってACおよびPKCの両経路を活性化することが報告されている<sup>38)</sup>。また、ヒトで同定された 4 つのスプライスバリエントは、いずれも両経路を活性化することが分かっている<sup>39)</sup>。今回のサル三叉神経節細胞では、スプライスバリエントは特定されていないが、細胞内経路の実験結果から、両経路を活性化するアイソフォームが発現している可能性が考えられた。

#### 2-2-3-3 PACAP による軸索伸長関連遺伝子の発現変化

PACAP による軸索伸長作用のメカニズムを遺伝子レベルでも確認するために、PACAP および神経軸索伸長の両方に関連する遺伝子の発現変化を調べることにした。PACAP 作用後に発現が変化する遺伝子は、既にニワトリの三叉神経細胞ではいくつか報告されており<sup>33)</sup>、その中でも、神経の分化形成因子として知られる follistatin に注目した。そこで、PACAP-27 と培養したサル三叉神経細胞から mRNA を抽出し、定量的 PCR 法にて follistatin を測定した結果、PACAP-27 で刺激したサル三叉神経節細胞では、PACAP 添加後 4 および 8 時間に follistatin の発現量が基剤群に対して有意に上昇し、その後減少しながらも、軸索伸長効果を評価した 48 時間後まで 2 倍以上の発現上昇が続いた(図 9B)。

Follistatin は、先述のニワトリの三叉神経細胞において PACAP 刺激後に遺伝子発現が 3.4 倍上昇しただけでなく<sup>33)</sup>、follistatin タンパクによる神経芽細胞からの軸索伸展作用も報告されている<sup>40)</sup>。これらの報告から、follistatin の発現上昇は軸索伸長のメカニズムの一つであると考えられ、サル三叉神経節細胞で観察された軸索伸長が PACAP による作用であったことを裏付けるものである。

#### 2-2-4 考察

以上の結果から、PACAP は、サル三叉神経節細胞に分布する PAC1 受容体に作用して、AC/PKA および PLC/PKC の両経路を活性化することにより、神経軸索の伸長を促進していることが示唆された。また、PAC1 受容体の分布結果より、PACAP が細胞体だけでなく軸索上の受容体に作用した場合でも軸索伸長効果が期待できる。

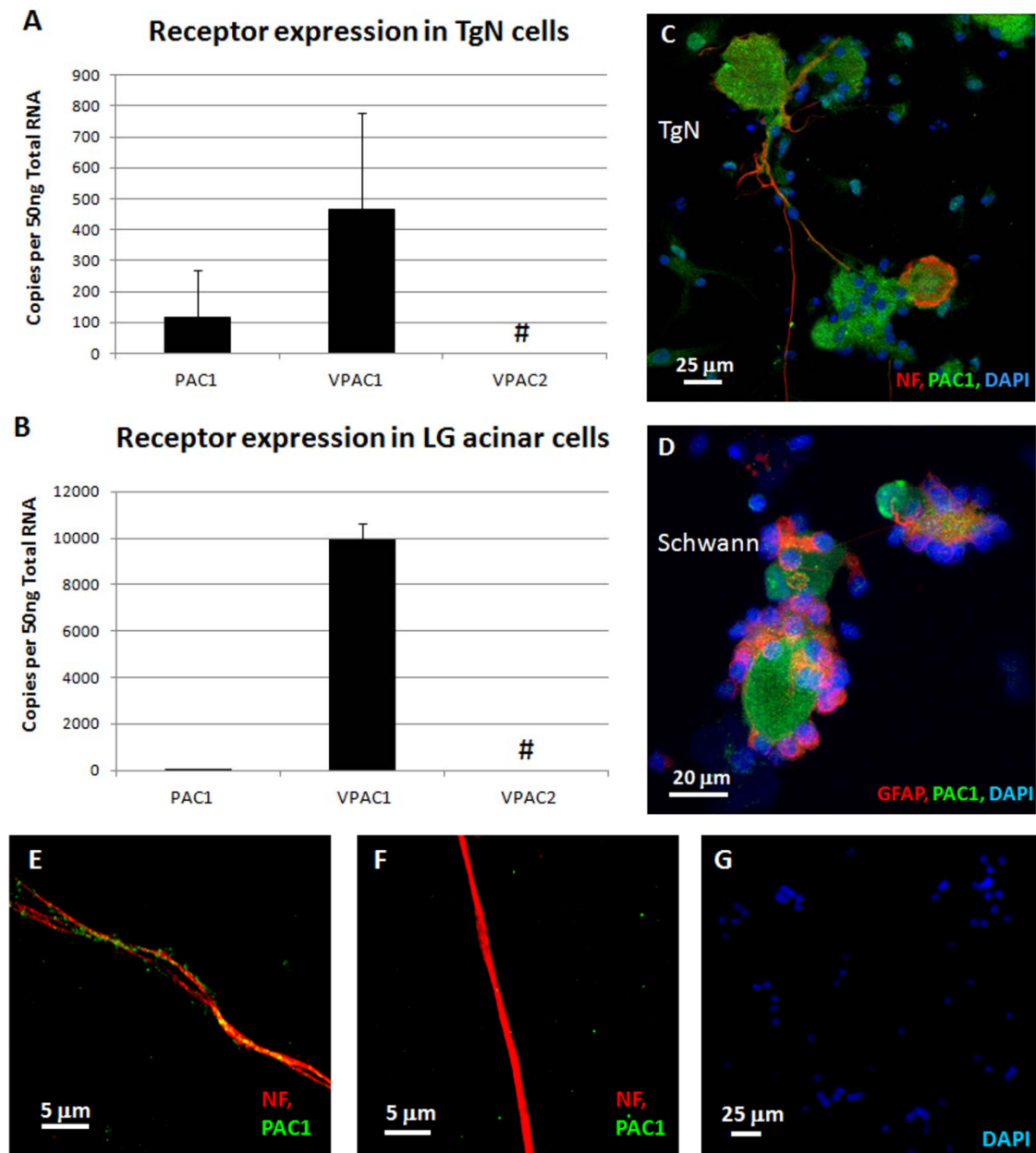


図 8. PACAP の受容体発現と分布

(A) サル三叉神経節から分離した細胞の mRNA を抽出し、3 種類の PACAP 受容体の発現を定量した。各値は 6 例の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。# 増幅は検出されたが、検量線の直線限界以下だった。(B) サル主涙腺から単離した腺房細胞の mRNA を抽出し、同様に 3 種類の PACAP 受容体の発現を定量した。各値は 4 例の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。(C) 神経節細胞 (赤) および (D) シュワン細胞 (赤) いずれにも PAC1 受容体 (緑) との共染部分 (橙) が観察された。(E) 強拡大した軸索 (赤) 上にも点状に染まる PAC1 受容体 (緑) の分布が認められた。(F) PAC1 受容体に対する一次抗体をあらかじめペプチド吸収することにより、PAC1 受容体 (緑) の染色が消失した。(G) 免疫染色の過程から、NF および PAC1 に対する一次抗体を省略すると、核 (青) のみが染色された。

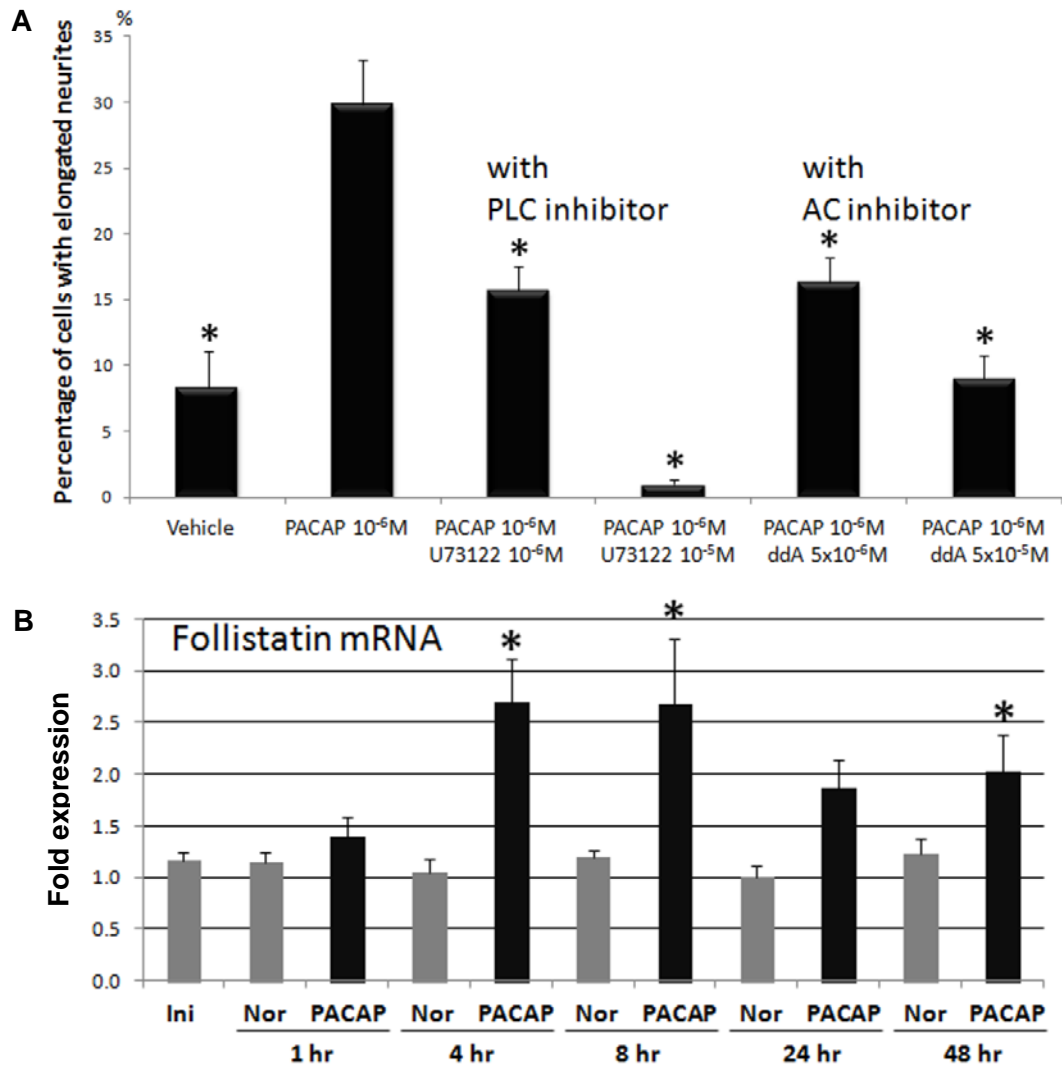


図 9. PACAP 刺激による細胞内シグナルおよび遺伝子発現の変化

(A) PACAP-27 による三叉神経節細胞からの軸索伸長は、PACAP 刺激の細胞内下流シグナルとして知られる PLC もしくは AC の阻害剤（それぞれ U73122 もしくは ddA）によって抑制された。各値は 3 例の平均値±標準誤差を示す。\*  $p < 0.05$ （基剤群に対する Dunnett 検定）。(B) PACAP-27（黒）もしくは基剤（灰）で各時間刺激したサル三叉神経節細胞から mRNA を抽出し、follistatin の発現を定量した。PACAP 添加前のサンプルを Initial (Ini) と示す。各値は 3 例の平均値±標準偏差を示す。\*  $p < 0.05$ （基剤群に対する Student の t 検定）。

## 第2章 — 第3節

### PACAP による涙液タンパク質分泌促進作用

#### 2-3-1 目的

神経伝達物質でもある PACAP は、中枢神経系から三叉神経や角膜に至る広い範囲の神経線維に分布していることから、涙腺からの涙液分泌に関与していることが予想される。そこで、PACAP-27 がサル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌を促進するかどうか調べた。

#### 2-3-2 実験材料および方法

1-1-2-3 項と同様に準備したサル主涙腺腺房細胞を、PACAP-27 もしくは VIP で 15 分間刺激した後に、培養上清中に分泌した涙液タンパク質 lactoferrin をイムノブロッティング (1-1-2-4 項) により検出した。また、サル主涙腺腺房細胞における受容体発現を定量的 PCR (2-2-2-3 項) により比較した。

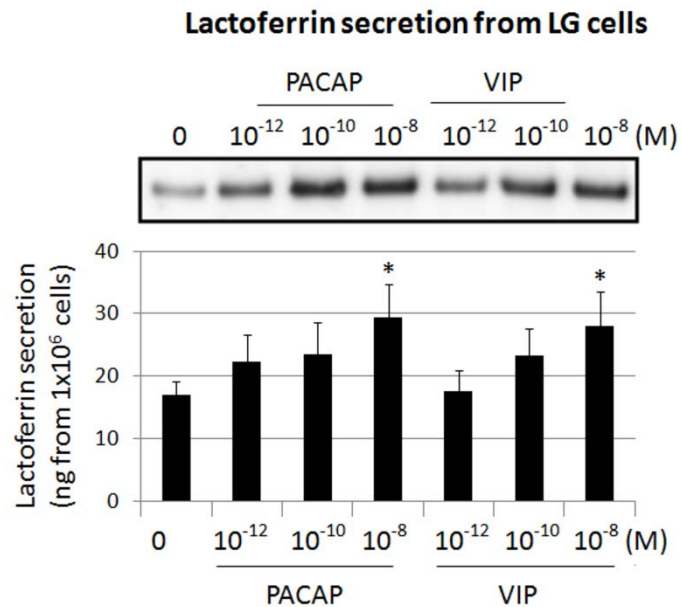
#### 2-3-3 結果

サル主涙腺から単離培養した腺房細胞を、PACAP-27 で 15 分間刺激したところ、PACAP の濃度依存的に lactoferrin の分泌量が増加し、 $10^{-8}$  M で基剤群に対して有意な分泌効果が認められた (図 10)。また、VIP による lactoferrin 分泌の促進作用も同様に濃度依存的に認められ、PACAP-27 と VIP による効果は同程度であった。なお、別の涙液タンパク質 lipocalin にも、同様の分泌増加は見られた (データ未掲載)。サル主涙腺腺房細胞における PACAP/VIP の 3 種類の受容体発現を調べた結果、主に VPAC1 受容体のみが発現していることが分かった (図 8B)。

#### 2-3-4 考察

予想通り、PACAP-27 には涙液タンパク質分泌を促進する作用が確認できた。サル主涙腺腺房細胞には VPAC1 受容体が圧倒的優位に発現していたこと、PACAP と VIP による涙液タンパク質分泌作用が同程度であったことから、本作用は PACAP と VIP に対する選択性が同等な VPAC1 受容体を介していると考えられた。





**図 10. PACAP もしくは VIP による涙液タンパク質の分泌**

サル主涙腺腺房細胞を各濃度の PACAP-27 もしくは VIP で 15 分間刺激した後、培養液中に分泌した lactoferrin をイムノブロットにより検出した。代表的な写真（上）とバンド密度の測定結果（下）を示す。各値は 6 例の平均値±標準偏差を示す。\*  $p<0.05$  (0 M に対する Dunnett 検定)。

## 小括

- ・ 本章では、角膜の三叉神経のダメージにより反射分泌が減少しているドライアイの治療を目指して、PACAP に注目し、サル三叉神経節細胞からの軸索伸展作用およびメカニズムを調べた。
- ・ サルから三叉神経節細胞を分離し、培養系を確立した。
- ・ PACAP-27 はサル三叉神経節細胞からの軸索伸展を促進した。
- ・ その作用は、PAC1 受容体を介して、AC/PKA および PLC/PKC の両経路を活性化することによって起こったことが示唆された。
- ・ PAC1 受容体は、サル三叉神経節細胞において、細胞体だけでなく軸索上にも分布が確認されたことから、PACAP が軸索に作用して軸索伸長を促す可能性が示唆された。
- ・ PACAP-27 による刺激後に、神経軸索の伸展に関連すると考えられる遺伝子 follistatin の発現上昇が認められた。
- ・ PACAP-27 は VPAC1 受容体を介して、サル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌を促進した。
- ・ これら 2 つの作用により、主涙腺からの涙液分泌を直接促すだけでなく、角膜の知覚神経の回復を早めることで反射分泌と瞬目の機能回復が期待できることから、PACAP はドライアイの治療に有用であると考えられた。

### 第3章 Galectin-3 による角膜上皮の創傷治癒作用

本章では、角膜上皮障害の修復を促進する候補物質として、galectin-3 に注目した。

涙液層の次に外界に面している角膜上皮は傷つく機会も多いが、通常は速やかに自然修復する。しかし、ドライアイで涙液の量や質が低下すると、涙液層が破綻した箇所から上皮は障害を受けやすくなるだけでなく、修復も遅くなる<sup>41)</sup>。また、障害を受けた上皮の上では、涙液層が不安定になるため破綻しやすく、上皮障害と修復遅延の悪循環に陥る。涙液層および角膜上皮の2つのバリア機能が低下した箇所は、感染の危険性が高く、炎症を伴い、穿孔化、遷延化、癬痕化する恐れがあるため、その前に速やかに上皮修復を促しバリア機能を回復させる必要がある。さらに、角膜上皮の障害は、眼不快感や視機能の低下を伴うため、一刻も早い治療が求められる。

創傷治癒過程の最初のステップは、障害部周辺に残った上皮細胞が傷の上に伸展移動し、接着して覆っていくことである。その後、細胞が増殖・分化して、基底膜の上に元の正常な上皮細胞の層構造を再形成していく<sup>42)</sup>。上皮細胞と基底膜との接着不良は上皮剥離再発の原因になり得ることから、創傷治癒過程において、伸展移動した上皮細胞が基底膜の成分である細胞外マトリックスに接着することも、重要と考えられている。

Galectinは糖鎖の $\beta$ -galactoside基に特異的に結合するレクチンであり<sup>43)</sup>、現在までにヒトでは16番まで同定されている。中でもgalectin-3は、眼組織のDNAマイクロアレイによる遺伝子解析の結果、角膜上皮に高発現していることが分かり（データ未公表）注目したところ、既にgalectin-3ノックアウトマウスにおける角膜上皮修復の遅延や、galectin-3がマウス角膜上皮の創傷治癒を促進する効果が報告されていた<sup>44)</sup>。また、そのメカニズムとして、galectin-3が角膜上皮細胞表面に存在するintegrin  $\alpha3\beta1$ に結合することによって、細胞の伸展移動に重要なラメリポディアの形成を促進したことが報告されている<sup>45)</sup>。しかし、欠損部に伸展移動してきた細胞が基底膜の細胞外マトリックスに接着する際に、galectin-3が直接関与しているかどうかは不明であった。そこで、本試験では、既報とは別の動物種であるラットの角膜、さらに、角膜の構造がよりヒトに近いサルの角膜を用いて、それぞれgalectin-3の上皮創傷治癒効果を確認すると共に、角膜上皮細胞と細胞外マトリックスの接着に及ぼすgalectin-3の影響について調べた。

### 第3章 — 第1節

#### Galectin-3 によるラット角膜の上皮修復促進作用と collagen IV の関与

##### 3-1-1 目的

Galectin-3 による角膜上皮の創傷治癒促進作用を、まずはラットの角膜を用いて確認した。また、そのメカニズムを調べるため、上皮修復過程で重要な役割を果たしていると考えられている基底膜の主成分 collagen IV と galectin-3 がどのように関与するかを調べた。

##### 3-1-2 実験材料および方法

###### 3-1-2-1 実験動物

角膜は雄性の Sprague-Dawley ラットから採取した。角膜上皮細胞の単離用には 6 週齢を、角膜の器官培養用には 9-11 週齢を用いた。動物の飼育および取扱いは、眼科・視覚研究における動物実験指針（ARVO Statement for the use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and the Guiding Principles in the Care and Use of Animals）に従った。また、本試験は千寿製薬株式会社の動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

###### 3-1-2-2 ラット角膜の器官培養

ペントバルビタールナトリウムで麻酔したラットの角膜中央に直径 3.5 mm のトレパンでしるしをつけ、その内側の上皮をハンディールーター（Tamiya）で機械的に剥離して上皮欠損を作成した。その後、摘出した角膜を培養液に浸漬し、37°C で 16 時間培養した。培養液は、Minimal Essential Medium に 1% nonessential amino acid solution、2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin および 100 µg/ml streptomycin（いずれも Life Technologies）を添加したものをを用いた。試験物質としてヒトのリコンビナント galectin-3（BioVision）を 20 µg/ml の濃度で培養液に加えた。Galectin-3 の濃度は、以前にマウスで上皮修復作用が報告されている 20 µg/ml を用いた<sup>44)</sup>。陽性対照には 20 ng/ml EGF（PeproTech）を、基剤群には PBS を galectin-3 の代わりに添加した。Galectin-3 の糖鎖認識ドメインが糖鎖のβ-galactoside 基に特異的に結合する性質を利用して、上皮修復作用が galectin-3 による特異的な作用かどうかを確認するために、β-galactoside 基を有するβ-lactose もしくは同基を含まない sucrose（いずれも Sigma-Aldrich）を 1 mM の濃度で galectin-3 と一緒に培養液に加えて評価した。

角膜の上皮欠損部位を 5%フルオレセインナトリウム（和光純薬工業）で染色した後、デジタルマイクロスコープ（Keyence Japan）で撮影し、画像解析ソフト Image Pro Plus

(Media Cybernetics) を用いて面積を計測した。培養の前後に測定した上皮欠損面積から、培養前に対する培養後の修復率を算出した。

#### 3-1-2-3 ラット角膜上皮細胞の単離

Kawakitaらのマウス角膜上皮細胞の単離培養方法<sup>46)</sup>を応用した。ラットから摘出した眼球を、15 mg/ml dispase II (Roche Diagnostics) を溶解した培養液に 4℃で終夜浸漬した。培養液は、primocin (Invivogen) 含有EpiLife medium (Life Technologies) を使用した。翌日、シート状に剥離した角膜上皮を 2 mlの 0.025% Trypsin/0.01% EDTA (Kurabo)に入れて、5 分毎にピペッティングしながら計 15 分間トリプシン処理した後、HEPESおよびトリプシン中和液 (Kurabo) を 5 mlずつ加えて酵素反応を停止した。細胞懸濁液を 40  $\mu$ mのセルストレーナー (BD Biosciences) に通して細胞塊を除き、遠心 (220  $\times$ g) により洗浄した後、上記の新しい培養液に再懸濁した。

#### 3-1-2-4 ラット角膜上皮細胞の collagen IV への接着試験

あらかじめマウスのcollagen IV (BD Biosciences) でコートした 96 ウェルプレートに、3-1-2-2 項で単離したラット角膜上皮細胞を  $2.5 \times 10^5$  cells/well播種し、ヒトのリコンビナントgalectin-3 (R&D Systems) を含む培養液中で 24 時間培養した。陰性対照には、細胞の接着作用ではなく増殖作用によって創傷治癒を促進することが知られているEGF (PeproTech) をgalectin-3 の代わりに用いた<sup>47,48)</sup>。培養後、非接着細胞は洗浄して除き、プレート上に接着した細胞を 2%パラホルムアルデヒドで固定後、0.1%クリスタルバイオレット (Sigma-Aldrich) で染色した。染色された細胞を顕微鏡 (Olympus) で観察し、画像解析ソフトImage Pro Plusを用いて染色細胞数を計測した。データは基剤群に対する比率で表示した。

#### 3-1-2-5 イムノブロッティング

3-1-2-4 項の細胞接着試験の結果に細胞の増殖作用が影響していないことを証明するために、細胞増殖時に増加する p44/22 mitogen-activated protein kinases (MAPK) のリン酸化をイムノブロッティングにより調べた。3-1-2-2 項で単離したラット角膜上皮細胞を、collagen IV でコートした 6 ウェルプレートに  $2.5 \times 10^6$  cells/well 播種し、24 時間培養して接着した細胞を galectin-3 もしくは EGF で 10 分間刺激した。その後、細胞を回収し、細胞溶解液から調製した可溶化タンパク質をイムノブロッティングに供した。イムノブロッティングの手順は 1-1-2-4 項と同様に実施し、一次抗体には、抗リン酸化 p44/42

MAPK 抗体および抗 total p44/42 MAPK 抗体（いずれも Cell Signaling Technology）を 1:500 希釈して使用した。また、アルカリフォスファターゼ標識二次抗体を使用し、alkaline phosphatase conjugate substrate kit（BioRad）を用いて検出したバンドの画像を ImageQuant LAS4000 で撮影した。

#### 3-1-2-6 Galectin-3 と collagen IV との結合試験

Galectin-3 と collagen IV とが直接結合するかどうかを sulfo-SBED Biotin Label Transfer Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて調べた。方法はキットの指示書に従った。Galectin-3 と collagen IV との結合反応は 37℃で 30 分間実施した。結合が galectin-3 の糖鎖認識ドメインによる特異的なものかどうかを確認するために、0.1 M  $\beta$ -lactose によって結合が阻害されるかどうか調べた。

#### 3-1-2-7 統計解析

得られたデータは、統計解析ソフト（JMP 10.0; SAS Institute Japan）を使用して Dunnett 検定もしくは Student の t 検定した。有意水準は 5%に設定した。

### 3-1-3 結果

#### 3-1-3-1 Galectin-3 によるラット角膜上皮の創傷治癒作用

ラット角膜の器官培養を用いて、機械的に剥離した上皮の galectin-3 による修復促進作用を調べた。培養後は、基剤群でも自然と上皮欠損面積が小さくなったが、培養液に galectin-3 を添加したところ、上皮修復が基剤群と比べて有意に促進した（図 11）。この galectin-3 による上皮修復促進効果は、 $\beta$ -galactoside 基を持つ $\beta$ -lactose によって競合阻害されたことから、galectin-3 の糖鎖認識ドメインが角膜上の何かに含まれる  $\beta$ -galactoside 基に特異的に結合した結果であることが示唆された。

#### 3-1-3-2 Galectin-3 によるラット角膜上皮修復のメカニズム

角膜上皮障害の修復過程において、伸展移動してきた上皮細胞は、基底膜の主要成分である laminin、fibronectin や collagen IV といった細胞外マトリックスに結合する必要がある。この中でも、collagen IV は角膜創傷治癒過程において一貫して発現が確認されており<sup>49)</sup>、またヒト角膜上皮細胞を使った実験において collagen IV に対する接着性が優れていたという報告があることから<sup>50)</sup>、上皮修復過程で重要な役割を果たしていると考え、collagen IV に対する galectin-3 の関与を調べた。

ラット角膜から単離した上皮細胞を用いて、collagen IV コート上への細胞接着を検討した結果、培養液に galectin-3 を 10  $\mu\text{g/ml}$  以上添加したときに、接着細胞数が基剤群に対して有意に増加した (図 12A)。データのばらつきを考慮すると、galectin-3 による接着促進効果は 10  $\mu\text{g/ml}$  でプラトーに達したと考えられる。一方、増殖作用により創傷治癒を促進することで知られている EGF を添加しても、collagen IV に対する細胞接着に変化は認められなかった。また、EGF で処理した角膜上皮細胞には、EGF 受容体の活性化を示す MAPK リン酸化の増加が確認されたが、galectin-3 で処理した細胞には同シグナルの増加は認められなかった (図 12B)。

上記のとおり、galectin-3 が collagen IV に対する細胞接着を促進することが分かったが、その際 galectin-3 が結合する相手については、以前に上皮細胞表面の integrin  $\alpha 3\beta 1$  に結合することが報告されている。そこで、galectin-3 は細胞にだけ結合するのか、それともマトリックス側にも結合するのかを調べるために、galectin-3 と collagen IV とのタンパク質レベルでの相互作用を調べた。その結果、Galectin-3 と collagen IV を混合すると、両者の結合体が検出され、その結合は $\beta$ -lactoseによって阻害されたことから (図 13)、galectin-3 の糖鎖認識ドメインが collagen IV の $\beta$ -galactoside 基を認識して特異的に結合することが分かった。

#### 3-1-4 考察

Galectin-3 は、ラット角膜の上皮修復を促進し、また、上皮細胞のcollagen IVに対する接着性を促進した。また、galectin-3 は上皮細胞表面のintegrin  $\alpha 3\beta 1$  に結合することが報告されているのに加えて<sup>45)</sup>、今回の試験では、galectin-3 がcollagen IVの $\beta$ -galactoside基に直接結合することが確認できた。以上の結果と、galectin-3 がリガンド存在下では五量体を形成して多価の結合活性を有する性質から<sup>51)</sup>、galectin-3 はcollagen IVと上皮細胞との複合体を形成することにより、細胞 - 細胞外マトリックス間の接着を促進し、上皮修復を促進したと考えられる。また、galectin-3 による作用機序はEGFとは異なるため、EGFに懸念されるようなEGF受容体を介して血管新生を引き起こす危険性はないと考えられた<sup>52)</sup>。

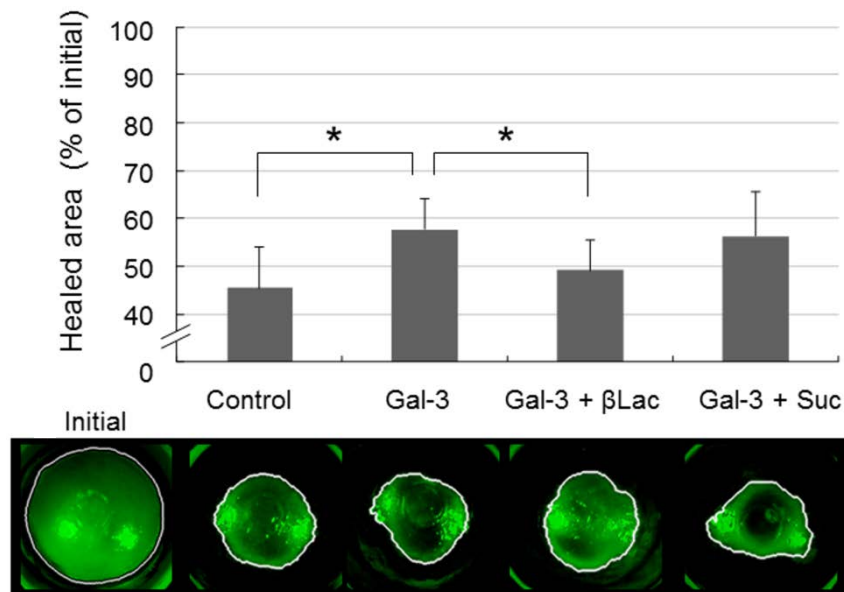
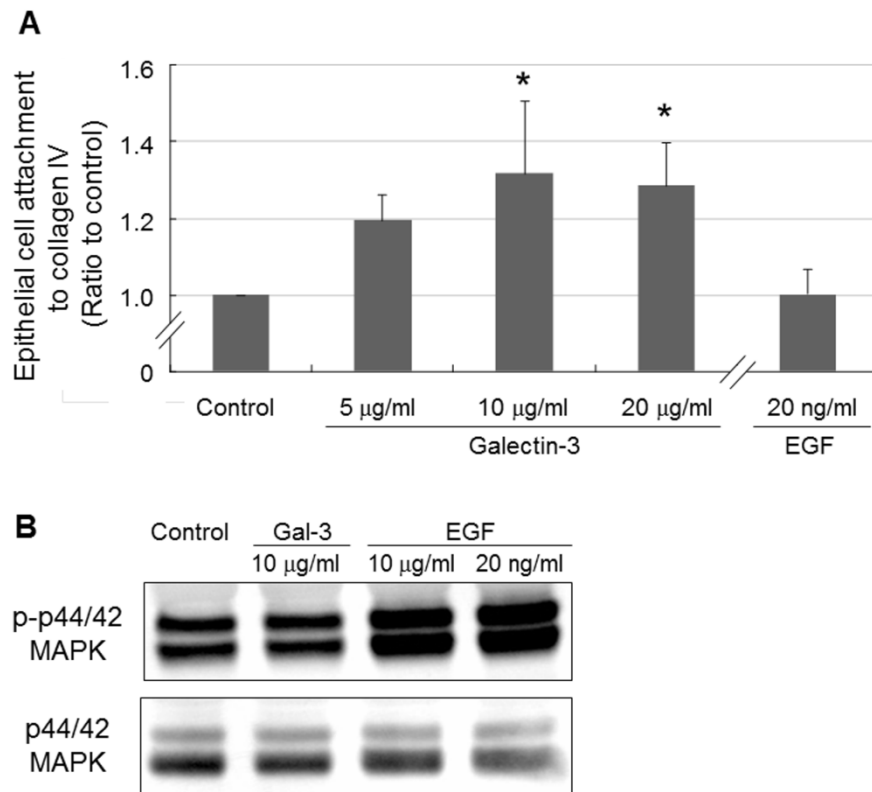


図 11. ラット角膜器官培養における galectin-3 による角膜上皮の創傷治癒作用

角膜上皮を機械的に剥離して上皮欠損部位を作成後 (Initial)、基剤 (Control)、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  galectin-3 単独 (Gal-3)、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  galectin-3 兼 1 mM  $\beta$ -lactose (Gal-3 +  $\beta\text{Lac}$ ) もしくは 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  galectin-3 兼 1 mM sucrose (Gal-3 + Suc) を入れた培養液中で 16 時間培養した。上皮欠損面積の修復率 (上) とフルオレセインで染色された上皮欠損部位の代表的な写真 (下) を示す。写真上で欠損部輪郭を白線でなぞった。各値は 7 例の平均値  $\pm$  標準偏差を示す。\*  $p < 0.05$  (Control もしくは Gal-3 に対する Student の  $t$  検定)。





**図 12. Galectin-3 によるラット角膜上皮細胞の接着促進作用**

(A) Collagen IV コーティングしたプレートに接着した角膜上皮細胞数は、基剤 (Control) と比較して galectin-3 によって増加したが、EGF による変化は認められなかった。Galectin-3 と EGF は別々に試験し、galectin-3 の試験では 4 例の、また EGF の試験では 7 例の平均値±標準偏差を示す。\*  $p < 0.05$  (Control もしくは Galectin-3 に対する Student の t 検定)。(B) ラット角膜上皮細胞を基剤 (Control)、galectin-3 (Gal-3) もしくは EGF でインキュベートした後に、リン酸化 p44/42 MAPK および total p44/42 MAPK をイムノブロットで検出した。代表的なイムノブロットの写真を示す。EGF はリン酸化を亢進させたが、Gal-3 による変化は認められなかった。

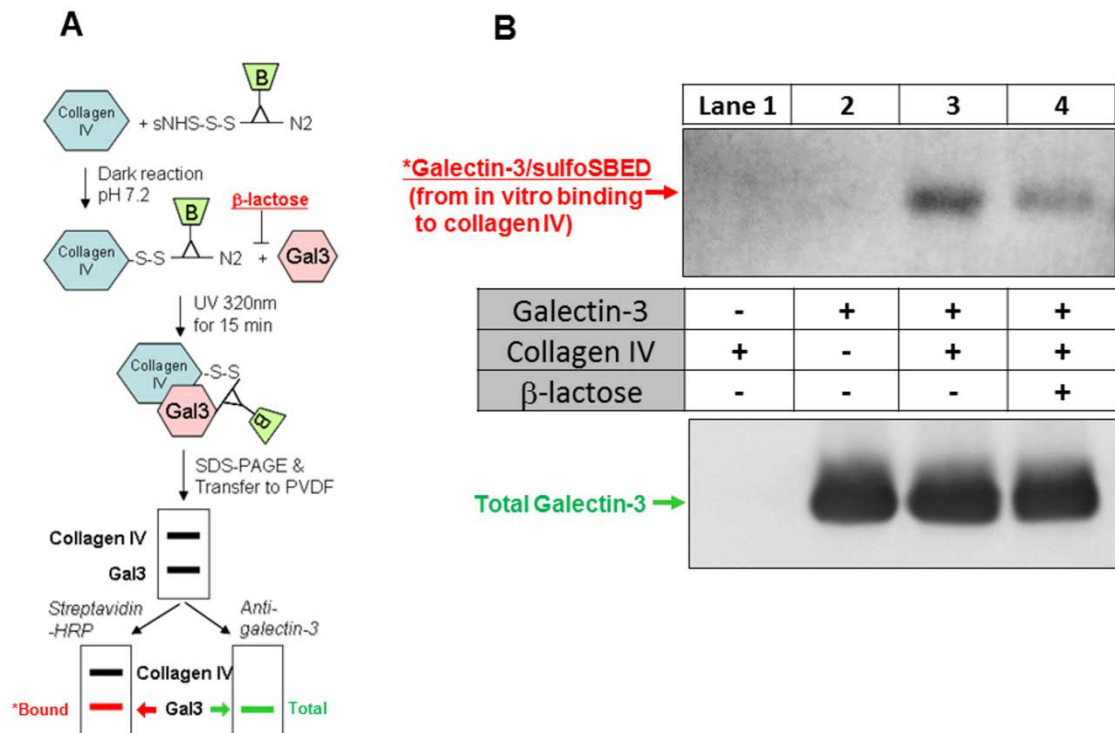


図 13. Galectin-3 と collagen IV との結合試験

(A) 結合試験の模式図を示す。まず、collagen IV (‘bait’タンパク質) を sulfo-SBED 標識することによりビオチン(biotin; B)化する。標識した collagen IV と galectin-3 (Gal-3、‘prey’タンパク質) とのインキュベーション中に両タンパク質が結合すると、紫外線 (ultraviolet; UV) 照射により‘prey’タンパク質と sulfo-SBED が共有結合する。その後、還元処理により sulfo-SBED 中 S-S 結合が切断されて、ビオチンが‘prey’タンパク質へ転移する。このビオチンを検出することにより、collagen IV に結合した galectin-3 (\*) が検出されることになる。(B) 代表的なイムノブロットの結果を示す。上の写真は in vitro で collagen IV に結合した galectin-3 を、表はインキュベーション内容を、下の写真はインキュベーションに用いた全ての galectin-3 を示す。

## 第3章 — 第2節

### サル角膜器官培養における上皮欠損モデルの比較

#### 3-2-1 目的

これまで、galectin-3 による上皮修復促進効果が複数のげっ歯類の角膜で認められてきたが、げっ歯類はヒトに比べてボーマン膜が薄く不鮮明であり<sup>53,54</sup>、角膜の構造に違いがあることから、よりヒトに近いサルの角膜でも評価することにした。まず本節では、サルの角膜を用いた上皮欠損モデルとその器官培養系を作成するために、アルカリもしくはアルコールによる化学的外傷を作成し、障害深度や培養後の上皮修復速度に違いがあるかどうか比較した。

#### 3-2-2 実験材料と方法

##### 3-2-2-1 実験動物

サル眼球は、Oregon National Primate Research Center のアカゲザル (*Macaca mulatta*) から、本研究とは別の目的で解剖された際に入手した。動物の飼育および取扱いは、眼科・視覚研究における動物実験指針 (ARVO Statement for the use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and the Guiding Principles in the Care and Use of Animals) に従った。

##### 3-2-2-2 サル角膜の器官培養

サル眼球の角膜中央に、1 規定の水酸化ナトリウム (NaOH; Sigma-Aldrich) もしくは n-heptanol (Alfa Aesar) を染み込ませた直径 7.5 mm のろ紙をそれぞれ 60 秒間もしくは 90 秒間押し当てた後、十分量の Hank's balanced salt solution (Life Technologies) で洗浄し、溶解した上皮は手術用メスを使って穏やかに取り除いた。サル角膜の直径はおおよそ 13-14 mm であり、周辺部の上皮は障害せずに残した。その後、角膜を摘出し、3-1-2-2 項と同じ培養液に浸漬し、37°C で培養した。

角膜の上皮欠損部位を 1%フルオレセインナトリウム (Sigma-Aldrich) で染色した後、FluorChem FC2 imager (Alpha Innotech) で撮影し、画像解析ソフト ImageJ 1.4.3.67 を用いて面積を計測した。培養の前後に測定した上皮欠損面積から、培養前に対する培養後の修復率を算出した。

病理切片を作成する場合は、培養前もしくは培養後の角膜を中性緩衝ホルマリン溶液に 1 日以上浸漬して固定した後、定法に従ってパラフィン包埋した。角膜の断面が観察で

きる方向に 4  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切し、ヘマトキシリンとエオジンで染色した。

上皮障害作成直後の角膜を電子顕微鏡で観察する場合は、角膜を 1.5%グルタルアルデヒドおよび 1.5%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) に浸漬して固定し、定法に従い、1%酸化オスミウム溶液で後固定した後、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切した切片を、酢酸ウラニル・クエン酸塩で染色し、透過型電子顕微鏡 (FEI Tecnai 12 TEM; FEI) で観察した。

### 3-2-2-3 統計解析

上皮修復速度の比較は、統計解析ソフト (JMP 8.0.1、10.0.0 もしくは 10.0.2; SAS Institute Japan) を用いて共分散分析した。有意水準は 5%に設定した。

### 3-2-3 結果

正常な角膜の断面を透過型電子顕微鏡で観察すると、ボーマン膜と上皮の間に無機質な基底膜が観察できた。作成直後の上皮欠損部の断面を同様に観察すると、NaOH で障害した角膜には基底膜がほとんど残っておらず、ボーマン膜が露出していたが、一方の n-heptanol で障害した角膜にはボーマン膜の上に基底膜が残っている様子が確認された (図 14)。

これらの角膜を器官培養し、経時的に観察すると、上皮の自然修復していく様子が観察できた。正常な角膜 (図 15A) は、中央部 (図 15 (i)) および周辺部 (図 15 (ii)) では 5-6 層の、リンバス部 (図 15 (iii)) では 8-9 層の上皮細胞で覆われており、上皮障害作成直後には中央部および周辺部の上皮がなくなり、リンバス部の上皮は無傷で残った (図 15B, C)。培養後、時間が経つにつれて、リンバス部の上皮層が徐々に薄くなり、周辺部に次いで中央部が徐々に単層もしくは二層の上皮に覆われていく様子が観察された (図 15B, C)。この経時的变化は両モデルに同様に見られ、リンバス部に残った上皮細胞が欠損部に伸展移動したと考えられた。2 つのモデルで唯一多少違ったのは、培養 12 時間後の結果で、NaOH モデルでは既に周辺部が上皮で覆われていたのに対して (図 15B (ii))、n-heptanolモデルの周辺部はまだ覆われていなかった (図 15C (ii))。両モデルの上皮修復スピードを比較すると、n-heptanolモデルでは培養 36 時間まではほぼ一定のスピードで修復が進んだのに対して、NaOHモデルでは 18 時間までの前半が速く、後半は遅くなり、2 つのモデルに違いが認められた (図 16, 表 2)。基底膜の有無が修復スピードに影響していると示唆される報告は過去にもあり<sup>55)</sup>、基底膜がない方が、最初の修復スピードが速くなる点は、今回の結果と一致していた。

#### 3-2-4 考察

サル角膜の器官培養を用いて、galectin-3 による創傷治癒作用を評価するにあたり、本節ではまず、NaOH もしくは n-heptanol を用いた化学的外傷により上皮欠損モデルを作成した。これら 2 つのモデルでは障害深度が異なり、n-heptanol モデルでは基底膜が、NaOH モデルではボーマン膜が露出した。また、これら角膜を器官培養したときの上皮の自然修復スピードにも、部分的ではあるが、両モデルに差が認められた。以上の結果から、これら 2 つは異なるモデルであると言える。サルの角膜を用いて上皮修復の評価系を確立したのは新規であり、さらに障害深度や修復スピードの異なる 2 つのモデルを確立できたことは、角膜上皮修復の研究において、ヒトへの外挿や病態の考察をするのに有用であると考えられる。これら 2 つのモデルを用いて評価することによって、galectin-3 の作用メカニズムによっては上皮修復作用に違いが見られる可能性があるため、次節で評価・比較することにした。

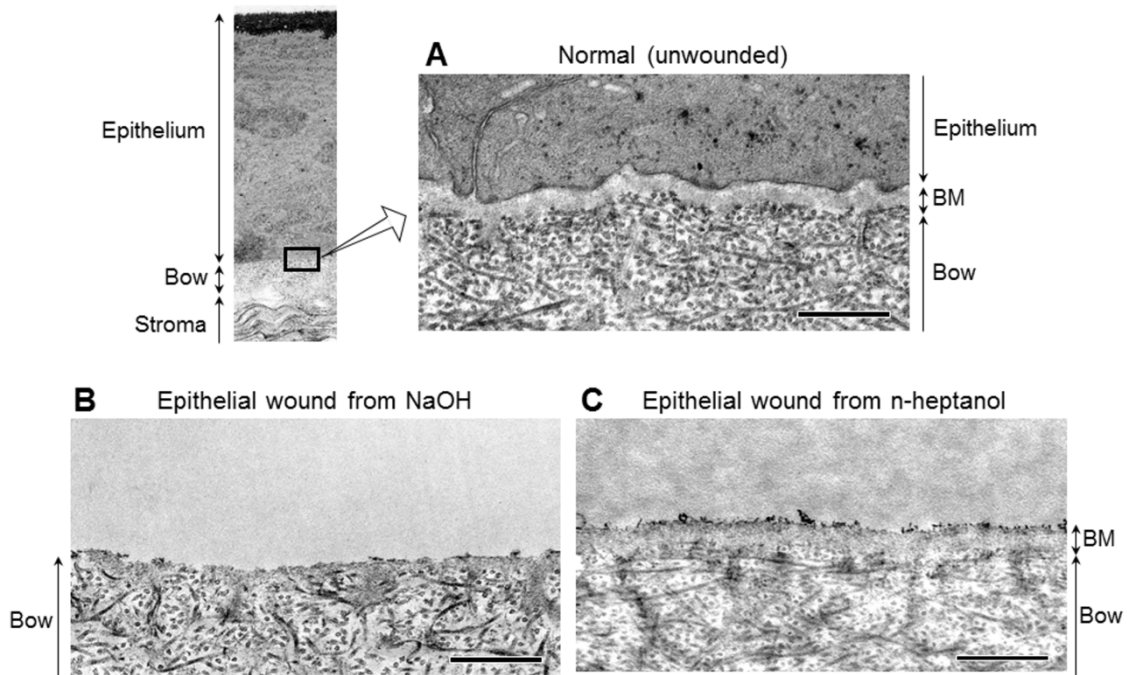


図 14. サル角膜上皮障害モデルの透過型電子顕微鏡観察

正常な角膜 (A) には、上皮とボーマン膜 (Bowman's membrane; Bow) の間に基底膜 (basement membrane; BM) が観察された。NaOH モデル (B) では、上皮と基底膜が消失していたが、n-heptanol モデル (C) では、上皮のみが除かれて基底膜は残っていた。スケールバーは 500 nm を示す。

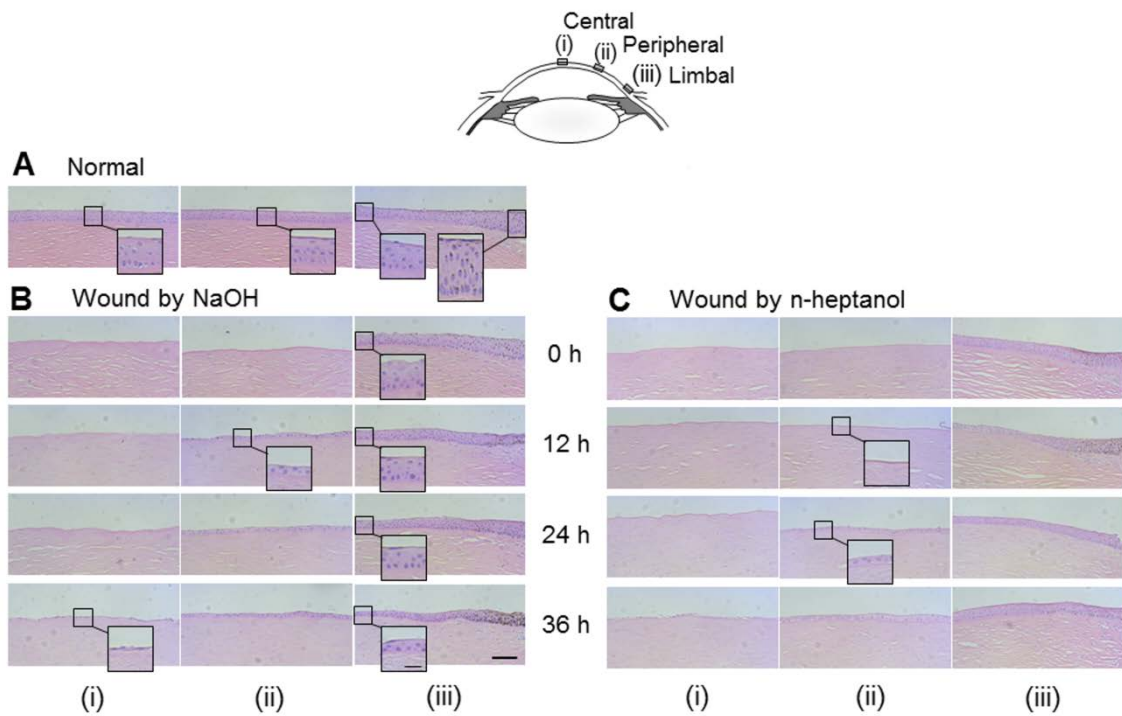


図15. サル角膜の器官培養における自発的な上皮障害修復過程

正常（非障害）（A）、NaOHモデル（B）およびn-heptanolモデル（C）の角膜断面をヘマトキシリンとエオジンで染色し、上皮欠損部が上皮に覆われて修復していく様子を経時的に観察した。それぞれ、角膜の中央部（i）、周辺部（ii）およびリンバス部（iii）の3か所の写真を示す。写真のスケールバーは100  $\mu\text{m}$ を、インサートのスケールバーは25  $\mu\text{m}$ を示す。

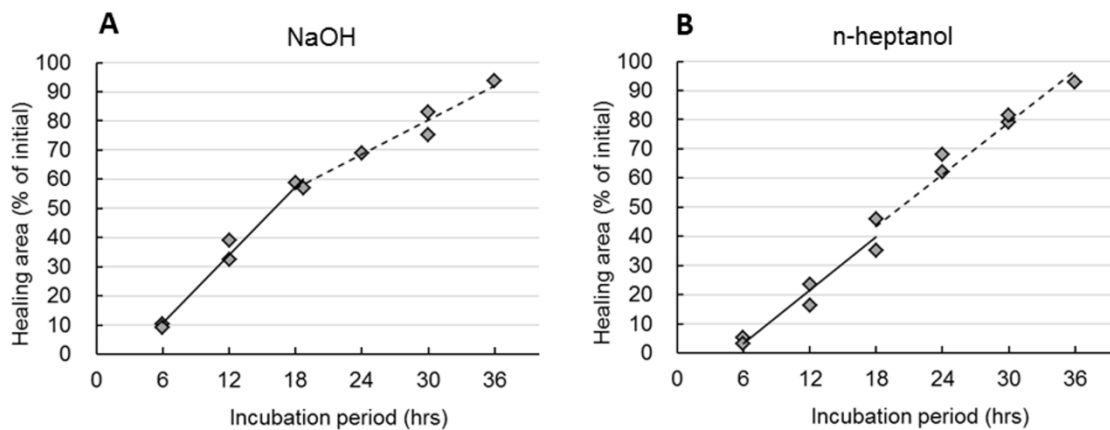


図 16. 2つの上皮障害モデルにおける自発的な修復率の比較

NaOH (A) もしくは n-heptanol (B) により上皮を障害したサル角膜を器官培養し、経時的に上皮の自然修復率を測定した。各菱形は個々のデータを示す。

表2. 図16の回帰直線の傾きから計算した上皮修復率

Incubation period	Healing rate (%/h)	
	6-18 h	18-36 h
NaOH	3.89*	1.96
n-heptanol	3.03	2.97†

\* $P < 0.05$  (18-36 hに対する共分散分析)

† $P < 0.05$  (NaOHに対する共分散分析)



### 第3章 — 第3節

#### Galectin-3 によるサル角膜の上皮修復促進作用とメカニズム

##### 3-3-1 目的

角膜の構造がこれまでのげっ歯類よりヒトに近いサルの角膜を用いて、galectin-3 の上皮修復作用を評価し、また、第二節で確認した 2 つのモデルにおける障害深度の違いが、galectin-3 による上皮修復作用に影響するかどうかを調べた。そのメカニズムとして、両モデルで露出する基底膜およびボーマン膜の主成分である様々な細胞外マトリックスに対して、galectin-3 が角膜上皮細胞の接着を促進するかどうかを調べた。

##### 3-3-2 実験材料および方法

###### 3-3-2-1 実験動物

3-2-2-1 項と同様に、アカゲザルの眼球を入手した。

###### 3-3-2-2 サル角膜器官培養における galectin-3 の上皮修復作用

3-2-2-2 項と同様に、サル角膜の器官培養を行った。片眼を基剤群に、反対眼を galectin-3 添加群に割り当てた。培養液中の galectin-3 濃度は、以前にマウスで上皮修復作用が報告されている 20  $\mu\text{g/ml}$  とした<sup>44)</sup>。培養時間は、両モデルの修復率が同程度であった 24 時間で評価した。

###### 3-3-2-3 サル角膜上皮細胞の単離培養

Kawakita らのマウス角膜上皮細胞の単離培養方法<sup>46)</sup>を応用した。サル眼球から角膜を摘出し、15 mg/ml dispase II (Roche Diagnostics) を溶解した培養液に 4℃で終夜浸漬した。培養液は、DMEM/F12 に Corneal Epithelial Cell Growth Kit (ATCC) を添加したものをを用いた。翌日、シート状に剥離した角膜上皮を 0.05% Trypsin-EDTA (Life Technologies) に入れて 37℃で 3 分間処理し、1.3% soybean trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich) を加えて酵素反応を停止した。ピペッティングして懸濁した細胞を 100  $\mu\text{m}$  のセルストレーナー (BD Biosciences) に通して細胞塊を除き、DMEM/F12 で洗浄し、再懸濁した。

###### 3-3-2-4 サル角膜上皮細胞の接着試験

96 ウェルプレート (Greiner Bio-One) に 0.001%の下記の各種細胞外マトリックスも

しくはインテグリンを 50  $\mu$ l/well 加えて、37°Cで1時間インキュベートすることによりコーティングした。細胞外マトリックスは human collagen type I、IV、V (いずれも BD Biosciences)、human fibronectin (BD Biosciences) もしくは human laminin-5 (Abcam) を、インテグリンは human recombinant integrin  $\alpha$ 1 $\beta$ 1、 $\alpha$ 3 $\beta$ 1、 $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (いずれも R&D Systems) を用いた。ウェルを Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Life Technologies) で洗浄した後、0.1% BSA を 50  $\mu$ l/well 加えて、37°Cで1時間ブロッキングした。ウェルを再度 DPBS で洗浄した後、20  $\mu$ g/ml galectin-3 (BioVision) を含む培養液 (サブプリメントは不含) を 50  $\mu$ l/well 加え、37°Cで1時間インキュベートし、その上から 3-3-2-3 項で準備したサル角膜上皮細胞を  $2 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ l/well 加えて、さらに 19 時間培養した。非接着細胞を穏やかに洗浄して除き、接着した細胞数を MTT assay (Promega) により測定した。

#### 3-3-2-5 サル眼組織中の galectin-3 のイムノブロッティング

涙液は希釈涙液として採取した。すなわち、眼球を摘出する前に、全身麻酔下のサルに DPBS を 100  $\mu$ l 点眼し、数回瞬目させて涙液となじませた後、希釈涙液を採取した。十分なタンパク質量を得るために、この操作を 2 回繰り返す。採取した希釈涙液は混合した。同じサルから、解剖時に腹大動脈から全血を採取し、遠心分離して血清を調製した。摘出した眼球から、前房水、角膜、結膜、虹彩、毛様体、水晶体、網膜を採取した。角膜および結膜は、手術用メスで上皮を掻き取り、実質と分けた。採取した組織を、1-2-2-1 項と同組成の細胞溶解バッファーに 1% Triton X-100 を加えた液に溶解して、遠心 (16,000  $\times$  g、10 分間) 後の上清をイムノブロッティングに供した。上清中のタンパク質濃度は BCA protein assay により定量した。

イムノブロッティングは 1-2-2-4 項と同様に実施した。一次抗体には、抗 galectin-3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を 1:100 希釈して使用した。

#### 3-3-2-6 統計解析

得られたデータは、統計解析ソフト (JMP 8.0.1、10.0.0 もしくは 10.0.2) を使用して Student の t 検定した。有意水準は 5%に設定した。

### 3-3-3 結果

#### 3-3-3-1 Galectin-3 によるサル角膜上皮の創傷治癒作用

NaOH もしくは n-heptanol による上皮欠損モデルを用いて、galectin-3 による上皮修

復作用を調べた結果、galectin-3 を培養液に添加した群では、基剤群に対して有意な上皮修復の促進が認められた (図 17)。この効果は、NaOH モデルおよび n-heptanol モデルにおいて同等であった。

### 3-3-3-2 Galectin-3 によるサル角膜上皮細胞の接着促進作用

Galectin-3 による上皮修復促進のメカニズムを調べるために、上皮欠損部で露出した各種細胞外マトリックス上への角膜上皮細胞の接着作用を検討した。その結果、ボーマン膜の主成分である collagen I および collagen V、基底膜成分である collagen IV、fibronectin、laminin-5 の合計 5 種類の全ての細胞外マトリックスに対して、galectin-3 存在下では非存在下と比べて有意な接着細胞数の増加が認められた (図 18 上)。さらに、これら 5 種類の細胞外マトリックスに対応する細胞表面のリガンドである 3 種類のインテグリン  $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$  のいずれに対しても、galectin-3 は細胞接着を促進した (図 18 下)。

### 3-3-3-3 Galectin-3 のサル眼組織内分布

Galectin-3 の眼内および眼周辺部における分布を調べるために、イムノブロッティングにより発現量を比較した。その結果、galectin-3 は、角膜および結膜の上皮に多く分布していることが分かった (図 19)。涙液、毛様体および虹彩にも薄いバンドが検出されたが、その他の眼組織には検出されなかった。

### 3-3-4 考察

よりヒトの角膜に構造に近いサルの角膜でも、galectin-3 による上皮創傷治癒の促進効果が認められた。Galectin-3 は、上皮欠損部位の障害深度に関わらず、NaOH モデルのボーマン膜上および n-heptanol モデルの基底膜上のいずれにおいても、上皮修復を同様に促進したことから、上皮障害が基底膜にまで達していないマイルドな症例から、基底膜の障害を伴う重症例まで、幅広い症例において galectin-3 による上皮修復効果が期待できる。

また、両モデルにおける galectin-3 の上皮修復効果を裏付けるように、ボーマン膜および基底膜に存在する主な細胞外マトリックス全てに対して、galectin-3 によるサル角膜上皮細胞の接着促進が認められた。さらに、galectin-3 は integrin  $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 1$  および  $\alpha 3\beta 1$  のいずれに対しても、細胞接着を促進した。この結果は、galectin-3 がインテグリン同士の相互作用を仲介したことを示唆する。一般に、細胞表面でインテグリンがクラスターを形成すると、細胞内にシグナルが流れ、細胞の接着や伸展移動を促す経路が活性化することが知られている<sup>56,57,58)</sup>。過去には Saravanan らが、galectin-3 が細胞表面にある integrin

$\alpha 3\beta 1$  のクラスター形成を促し、細胞内シグナルのfocal adhesion kinaseやRac1 を活性化することにより、ラメリポディアの形成を促進したことを報告している<sup>45)</sup>。以上のことから、galectin-3 による角膜上皮修復促進のメカニズムを推察すると、galectin-3 が各種インテグリンのクラスター形成を誘導したことにより上皮細胞の伸展移動が促進し、またgalectin-3 がボーマン膜および基底膜上での細胞接着を促進したことで、上皮修復が促進したと考えられた。

サル眼組織におけるgalectin-3 の発現を確認したところ、角膜や結膜の上皮に高発現していたが、涙液中の分布量は極僅かであった。同様の結果はヒトの涙液でも報告があり、健常人の涙液中にはgalectin-3 は検出されなかった<sup>43)</sup>。一方で、炎症性の眼疾患では涙液中にgalectin-3 が検出されており、眼表面の障害を自己修復するために高発現部位から放出されたのではないかと考えられる。涙液中のgalectin-3 濃度の増加はドライアイ患者でも確認されているが、その濃度は本試験で上皮修復効果が認められた濃度には及ばず、また約半数のドライアイ患者の涙液中では、galectin-3 が分解されて活性を失った形で見つかった<sup>59)</sup>。以上のことから、上皮修復が遅延されているドライアイにおいて、galectin-3 を点眼して涙液中の濃度を上げることにより、角膜の上皮障害治癒を促す効果が期待できると考えられた。

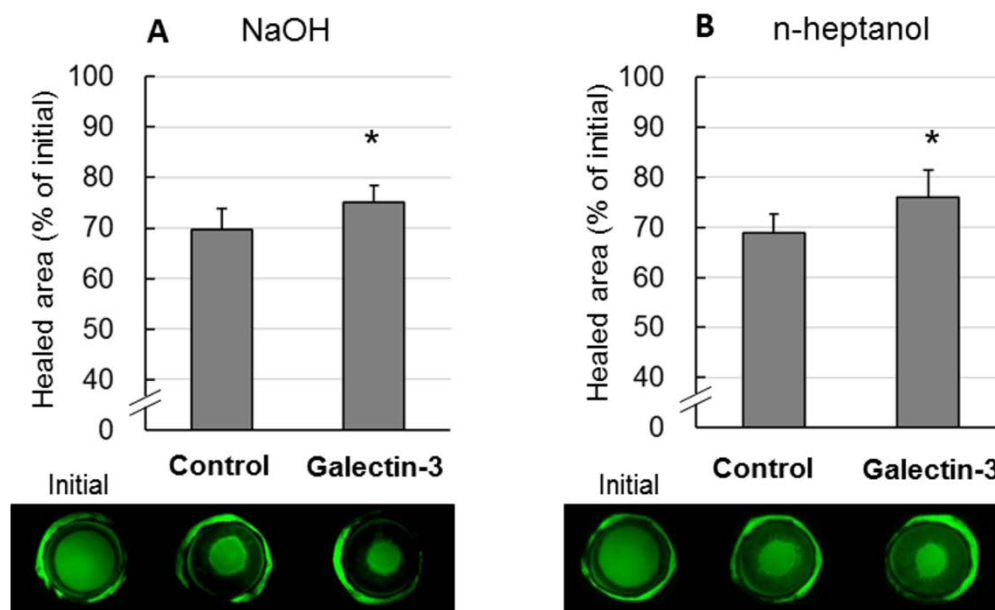


図 17. サル角膜器官培養における galectin-3 による上皮修復促進作用

NaOH (A) もしくは n-heptanol (B) によって上皮欠損部位を作成後 (Initial)、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  galectin-3 を加えた培養液中で 24 時間培養し、上皮欠損面積の修復率(上)を測定した。フルオレセインで染色された上皮欠損部位の代表的な写真 (下) と共に示す。各値は 5 例の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。\*  $p < 0.05$  (Control に対する Student の t 検定)。

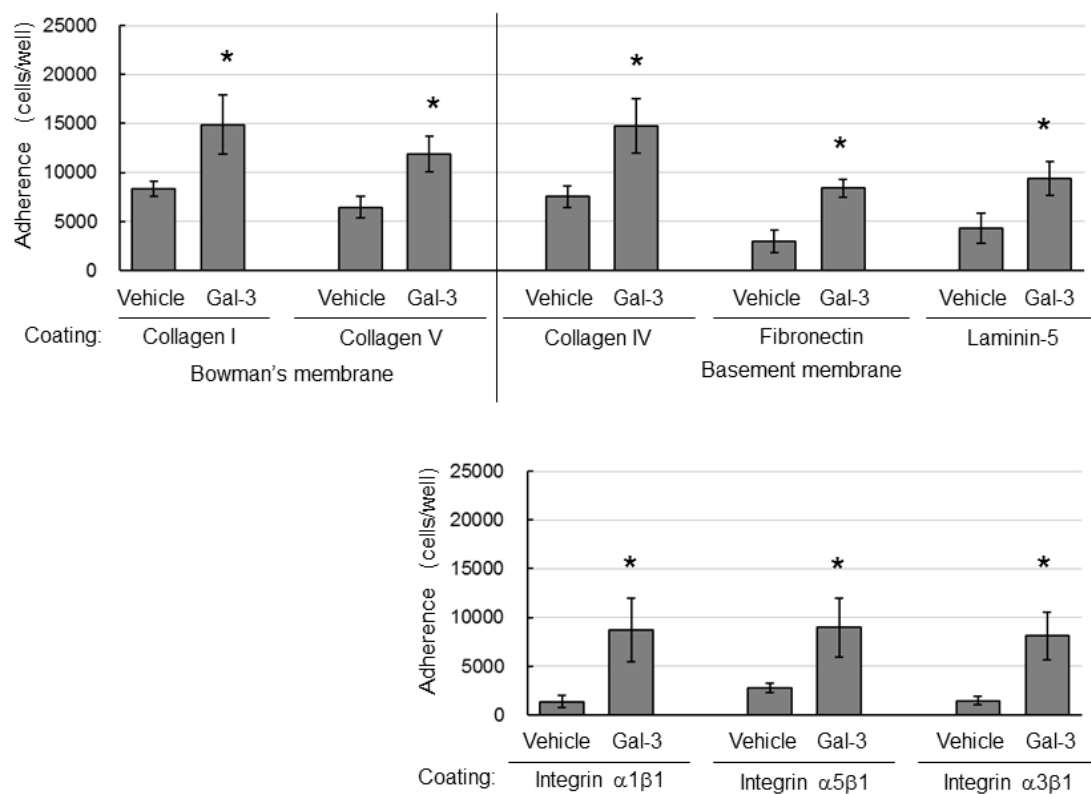


図 18. Galectin-3 によるサル角膜上皮細胞と細胞外マトリックスおよびインテグリンとの接着促進作用

5 種類の細胞外マトリックス（上）もしくは 3 種類のインテグリン（下）でそれぞれコーティングしたプレート上に接着したサル角膜上皮細胞数は、いずれのコーティングにおいても、20  $\mu\text{g/ml}$  galectin-3 (Gal-3) 存在下では基剤 (Vehicle) より増加した。各値は試験 4 回分の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。1 試験毎に別のサルから採取した細胞を使用した。

\*  $p < 0.05$  (Vehicle に対する Student の t 検定)。

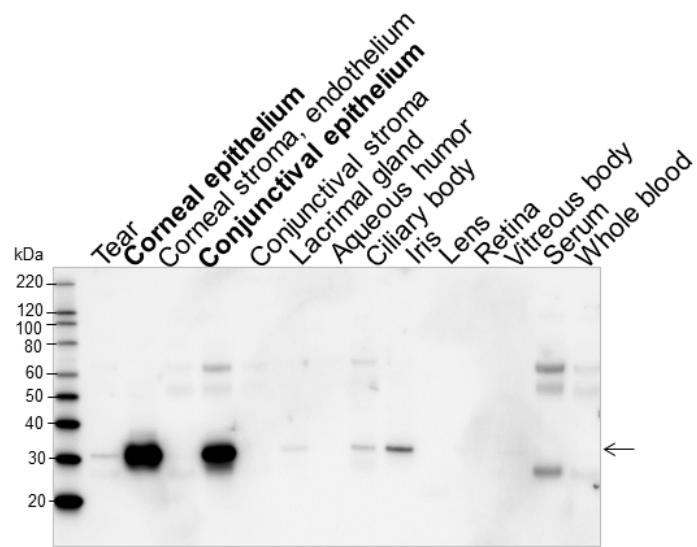


図 19. イムノブロットによる galectin-3 (矢印) のサル眼組織内分布

## 小括

- ・ 本章では、角膜上皮障害を修復することによって、涙液の安定性および眼不快感や視機能低下を改善し、ドライアイを治療することを目指して、galectin-3 による角膜上皮の修復作用およびメカニズムを調べた。
- ・ サル角膜の器官培養による上皮修復の評価モデルを新規に確立した。
- ・ Galectin-3 は、ラットおよびサルの角膜上皮障害に対して、修復促進効果を示した。
- ・ その効果は、基底膜の有無に関わらず、ボーマン膜が露出したモデルでも同等に認められた。
- ・ Galectin-3 は、基底膜およびボーマン膜を構成する主な細胞外マトリックス全てに対して、サル角膜上皮細胞の接着を促進した。また、インテグリンに対する細胞接着も促進したことから、インテグリンクラスター形成により上皮細胞の接着や伸展移動を活性化している可能性が示唆された。
- ・ Galectin-3 が角膜上皮細胞の接着を促進する際の作用機序は、EGF とは異なり、EGF 受容体を介した血管新生誘発の危険性はないことを確認した。
- ・ Galectin-3 は涙液中にはほとんど存在しないため、点眼により涙液中の濃度を上げることにより、基底膜の有無に関わらず、様々な重症度の上皮障害に対して修復促進効果が期待できると考えられた。



## 総 括

ドライアイの歴史は比較的浅く、従来は涙液減少による角結膜炎というシンプルな概念として捉えられていたが、1995年にNational Eye Instituteにより初めてドライアイの定義と診断基準が発表されて以降<sup>60)</sup>、基礎的および臨床的な研究が急速に進み、眼表面の種々の因子が複合的に影響し合って病態を形成していることが分かってきた。それを反映して、世界のドライアイ専門家で結成されたDry Eye WorkShop (DEWS) が2007年に発表した最新の定義には、ドライアイが「多因子による疾患である」こと、「眼不快感だけでなく視機能異常を伴う」こと、さらに「涙液の安定性低下」に加えて「涙液浸透圧の上昇と眼表面の炎症が関与する」ことが盛り込まれた<sup>3)</sup>。また、治療方法にも、抗炎症薬による治療が積極的に紹介されている。一方、日本国内のドライアイ研究会も、2006年に日本のドライアイの定義と診断基準を改定した<sup>1)</sup>。緒言の冒頭で紹介したとおり、その内容には、DEWSと整合性を図って、「様々な要因による」慢性疾患であり、「眼不快感や視機能異常を伴う」ことが明記されたが、米国を中心とした諸外国で重視されている「涙液浸透圧の上昇と眼表面の炎症」に関しては、日本の定義には盛り込まれなかった。また、ドライアイの本質は炎症というよりも涙液の不安定性にあるという考え方にに基づき、日本発の新しい治療方針として、眼表面の各層（上皮、液層、油層）を層別に治療して涙液層破綻を改善することによりドライアイを治療する「層別治療」(Tear Film Oriented Therapy) が提案されている<sup>2)</sup>。なお、日本でも炎症の関与が否定されているわけではなく、層別治療のターゲットの一つには眼表面炎症が取り上げられている。

このように、米国を中心とした諸外国と日本との間で、ドライアイのとらえ方や治療方針が少なからず異なる背景には、各国で開発されたドライアイ治療薬が大いに影響していると考えられる。炎症が重視されている米国では、2003年に承認された免疫抑制剤であるシクロスポリン点眼液が、唯一の医療用医薬品である<sup>4,61)</sup>。同薬剤は、製剤改良されて2015年に欧州でも承認されたが、日本ではドライアイ治療の適応はない。一方、涙液の安定性が重視されている日本では、保水作用に優れたヒアルロン酸点眼液に加えて、涙液安定性に重要なムチンを増加させるジクアホソルナトリウム点眼液およびレバミピド点眼液が、2010年以降に立て続けに承認された<sup>7)</sup>。ジクアホソルナトリウム点眼液は、その後、米国でもPhase IIIまで進んだが、承認には至らなかった。ムチン分泌促進剤は、その他の国々でも開発中であるが、現在のところ承認販売されているのは日本のみである。このように、ドライアイ治療薬の承認数が最も多い日本ですら、その選択肢は非常に限られているのが現状である。

現在、日本のドライアイ治療では、人工涙液による水分補充に加えて、必要に応じて上記点眼薬による薬物療法が行われているが、これらだけでは症状のコントロールが不十分な症例には、涙点プラグ挿入による涙液排出量の調節や、涙液の質を改善するために涙液成分に近い自己血清点眼が用いられることや、適応外治療のステロイド剤や免疫抑制剤が併用される場合もある<sup>8)</sup>。患者により適した治療法で、十分に症状をコントロールするためには、眼表面の多様な異常に対応できるよう、治療薬の選択肢の充実が望まれている。そのためには、既存薬の承認国追加だけでなく、既存薬とは異なる薬理作用を持つ新しいドライアイ治療薬の開発が必要であり、実際に、現在各国で、ドライアイの様々な要因をターゲットにした新薬が開発されつつある<sup>8,61)</sup>。

そこで、本研究では、ドライアイ治療薬の選択肢を増やすべく、既存薬とは異なる3つの薬理作用をターゲットにして基礎研究に取り組んだ。1つ目のターゲットは、涙液タンパク質の分泌促進作用であり、涙液の質が改善される。2つ目は三叉神経の、3つ目は角膜上皮の修復促進作用をターゲットにした。三叉神経自身は層別治療の対象ではないが、涙液の反射分泌を司り、眼表面の健常性維持には欠かせない存在である。また、上皮の傷が修復することにより、涙液の安定性だけでなく、眼不快感や視機能の改善も期待できる。これら全ての作用を合わせ持つ物質が見つければ理想的であったが、本研究では、それぞれの作用を示す3種類の生体内タンパク質 *lacritin*、*PACAP*、*galectin-3* に注目し、それぞれの効果とメカニズムを調べた。

第1章では、自身も涙液タンパク質である *lacritin* が、オートクラインに作用して、サル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌を促進することを示した。ドライアイを模して炎症性サイトカインで処理した細胞では、神経伝達物質のアナログである *carbachol* による分泌が減少したのに対して、*lacritin* は炎症下でも影響を受けることなく分泌を促進した。炎症を伴うドライアイでは、神経伝達物質の分泌減少並びに機能低下によって、*lacritin* を含めた涙液タンパク質の分泌が減少すると考えられるが、炎症状態下でも涙液タンパク質の分泌促進効果のある *lacritin* を補充することにより、ドライアイの症状改善が期待できる。これまでも *lacritin* による涙液分泌増加はラットやウサギで報告されていたが<sup>10,14)</sup>、*lacritin* の発現がヒトを含めた霊長類に選択的に認められていることから<sup>9,10)</sup>、今回、サルから単離した細胞を用いて効果を確認できたことは、実証実験として意義があると考えられる。また、これまで米国を中心に盛んに行われてきたドライアイと炎症に関する研究成果によって、炎症下では涙液分泌機能が低下することは分かっていたが<sup>6)</sup>、今回、炎症下でも影響を受けることなく分泌促進作用を示す物質が見つかったことは、炎症を伴うドライアイの治療薬開発に向けて一歩前進したと言えるであろう。

第2章では、PACAPによるサル三叉神経節細胞からの軸索伸長作用を調べた。PACAPによる軸索伸長作用と角膜知覚の改善はウサギでは既に確認されていたが<sup>26)</sup>、本研究では、よりヒトに近いサルの三叉神経節細胞の培養系を新規に確立したことにより、PACAPによる三叉神経の軸索伸長作用がサルでも確認された。そのメカニズムは、PAC1受容体からAC/PKAおよびPLC/PKCの両経路を介していることが示唆され、また、PACAP刺激により、神経分化誘導因子follistatinのmRNA発現上昇が確認された。また、培養細胞を用いることで、PAC1受容体の詳細な分布を明らかにした。これにより、PACAPが、眼表面に分布する三叉神経の軸索に作用することで、ドライアイで傷ついた三叉神経の修復を促進し、その結果、低下していた涙液の反射分泌機能が回復し、ドライアイの症状改善が期待できると考えられる。これまで、知覚神経をターゲットにしたドライアイ治療薬は開発されておらず、本研究の結果は、新しい選択肢の可能性を示したと考えられる。さらに、PACAPによるサル主涙腺腺房細胞からの涙液タンパク質分泌作用も認められたことから、PACAPには、神経および涙液の2つの側面からの治療効果が期待できる。

第3章では、galectin-3がラットおよびサルの角膜器官培養において、上皮創傷治癒を促進したことを示した。以前、マウスでも効果が報告されているが<sup>44)</sup>、今回、角膜の構造がヒトと類似しているサルの角膜器官培養系を新規に確立したことにより、サルも含めて複数の動物種で効果が検証できたことになる。そのメカニズムは、galectin-3が角膜上皮細胞と細胞外マトリックスとの接着およびインテグリンクラスターの形成を促進することによって、上皮修復過程に必要な細胞の伸展移動と上皮欠損部位への接着を促したと考えられた。また、今回、障害深度の異なる2つのモデルでgalectin-3による角膜上皮の修復促進効果が同様に確認されたことから、軽度な上皮障害から重症化した場合まで幅広い病状に対してgalectin-3が効果を示す可能性が予想される。傷ついた上皮が修復することにより、涙液の安定性が改善するだけでなく、ドライアイに伴う眼不快感や視機能低下の改善も期待される。

本研究では、lacritin、PACAPおよびgalectin-3がそれぞれ、涙液タンパク質分泌、神経軸索伸長および角膜上皮修復といった既存薬とは異なる作用により、ドライアイの眼表面に生じた異常を改善する可能性を示した。本研究は未だ基礎研究の段階にあるが、いずれもサルの材料を用いて効果が確認されたことから、ヒトへの高い外挿性が期待できる。今後、これらの基礎研究が一つでも多くまた早く臨床研究へと進み、治療薬となって選択肢の拡充に貢献することが期待される。

一方で、選択肢が増えるに従い、病状に適した治療薬を選択する必要がある。日本で推奨されているドライアイの層別治療には、現在利用可能な治療法が並べられているが、

眼表面のどの層に異常があるかを調べるために、涙液層の破綻パターンから診断する方法が提案されている<sup>2)</sup>。抗炎症薬を有し、炎症が重視される米国では、涙液の浸透圧が炎症と関連することを証明し、ドライアイの診断に用いている<sup>3)</sup>。しかし、これらの検査方法で見つかる異常は、既存薬のターゲットが中心となっており、多岐に渡るドライアイの要因を網羅しているとは言えない。今後、既存薬とは異なる作用の新薬を開発するうえで、そのターゲットとなる異常を、臨床現場で非侵襲的に診断できる検査方法を提案することも、今後の課題である。

## 謝 辞

本稿をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました武庫川女子大学薬学部の木下健司教授、篠塚和正教授、中村一基教授ならびに村田成範准教授に深く感謝いたします。

また、本研究に携わる機会を与えてくださるとともに、本研究遂行を終始にわたり御指導、御鞭撻くださいました千寿製薬株式会社 オキュラーサイエンス研究所の東光佳博士、ならびにコンサルタントで Oregon Health & Science University, Department of Integrative Biosciences の Dr. Thomas R. Shearer に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行に格別のご支援、ご協力を賜りました千寿製薬株式会社 オキュラーサイエンス研究所の森本（栃木）あゆみ氏、Mr. Ryan D. Walkup、中嶋恵美博士、薮田知穂博士、および宮下（矢野）史子氏に深く感謝いたします。また、本稿をまとめるにあたり、過分にご支援くださいました同研究所の松本隆弘氏および岡隆之博士に深謝いたします。

また、涙液ラクリチンの精製は千寿製薬株式会社 オキュラーサイエンス研究所の中嶋毅博士に、共焦点顕微鏡の使用ならびに技術指導は Oregon National Primate Research Center の Dr. Anda Cornea に、電子顕微鏡による解析は Oregon Health & Science University, the Immuno Electron Microscopy Core の Dr. Robert J Kayton および Dr. Lisa Dirling Vecchiarelli に、病理切片の作成は MedSurge Pathology の Dr. Rolly Perez に、それぞれ協力していただきました。厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を陰から常に支えてくれた家族と愛猫に心から感謝します。

## 参考文献

- 1 島崎潤（ドライアイ研究会）. 2006 年ドライアイ診断基準. あたらしい眼科 2007; 24:181–184.
- 2 横井則彦, 加藤弘明. ドライアイ診療のパラダイムシフト. 眼表面の層別診断・層別治療. 京府医大誌 2013; 122:549–558.
- 3 Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). The definition and classification of dry eye disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop. Ocul Surf 5:75–92.
- 4 Stern ME, Schaumburg CS, Pflugfelder SC. Dry eye as a mucosal autoimmune disease. Int Rev Immunol. 2013; 32:19–41.
- 5 Dartt DA. Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. Prog Retin Eye Res. 2009; 28:155–177.
- 6 Zoukhri D, Hodges RR, Byon D, Kublin CL. Role of proinflammatory cytokines in the impaired lacrimation associated with autoimmune xerophthalmia. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002; 43:1429–1436.
- 7 加藤弘明, 横井則彦. ムチンの産生を増やす治療. あたらしい眼科 2013;29:329–332.
- 8 中村雅胤. ドライアイ研究の最前線. 日本薬理学雑誌 2010; 135(4):138–141.
- 9 Nakajima T, Walkup RD, Tochigi A, Shearer TR, Azuma M. Establishment of an appropriate animal model for lacritin studies: cloning and characterization of lacritin in monkey eyes. Exp Eye Res. 2007; 85:651–658.
- 10 Sanghi S, Kumar R, Lumsden A, et al. cDNA and genomic cloning of lacritin, a novel secretion enhancing factor from the human lacrimal gland. J Mol Biol. 2001; 310:127–139.
- 11 Morimoto-Tochigi A, Walkup RD, Nakajima E, Shearer TR, Azuma M. Mechanism for carbachol-induced secretion of lacritin in cultured monkey lacrimal acinar cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51:4395–4406.
- 12 Koo B, Lee D, Ha H, Kim JC, Kim CW. Comparative analysis of the tear protein expression in blepharitis patients using twodimensional electrophoresis. J Proteome Res. 2005; 4:719–724.
- 13 Nichols JJ, Green-Church KB. Mass spectrometry-based proteomic analyses in contact lens-related dry eye. Cornea. 2009; 28:1109–1117.
- 14 Samudre S, Lattanzio FA Jr, Lossen V, et al. Lacritin, a novel human tear

- glycoprotein, promotes sustained basal tearing and is well tolerated. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52:6265–6270.
- 15 Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res.* 1999; 19:201–211.
  - 16 Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell PA. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea.* 2009; 28:1023–1027.
  - 17 Boehm N, Riechardt AI, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus FH. Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52:7725–7730.
  - 18 Zoukhri D, Kublin CL. Impaired neurotransmitter release from lacrimal and salivary gland nerves of a murine model of Sjögren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:925–932.
  - 19 Vantaku VR, Gupta G, Rapalli KC, Karnati R. Lacritin Salvages Human Corneal Epithelial Cells from Lipopolysaccharide Induced Cell Death. *Sci Rep.* 2015;5:18362.
  - 20 Zoukhri D. Mechanisms involved in injury and repair of the murine lacrimal gland: role of programmed cell death and mesenchymal stem cells. *Ocul Surf.* 2010;8:60–69.
  - 21 Hayashi T. Dysfunction of lacrimal and salivary glands in Sjögren's syndrome: nonimmunologic injury in preinflammatory phase and mouse model. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:407031.
  - 22 Heitmeier MR, Kelly CB, Ensor NJ, et al. Role of cyclooxygenase-2 in cytokine-induced beta-cell dysfunction and damage by isolated rat and human islets. *J Biol Chem.* 2004;279:53145–53151.
  - 23 Patel S, Perez-Santonja JJ, Alio JL, Murphy PJ. Corneal sensitivity and some properties of the tear film after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 2001; 17:17–24.
  - 24 Toda I, Asano-Kato N, Komai-Hori Y, Tsubota K. Dry eye after laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2001; 132:1–7.
  - 25 Lee BH, McLaren JW, Erie JC, Hodge DO, Bourne WM. Reinnervation in the cornea after LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:3660–3664.

- 26 Fukiage C, Nakajima T, Takayama Y, Minagawa Y, Shearer TR, Azuma M. PACAP induces neurite outgrowth in cultured trigeminal ganglion cells and recovery of corneal sensitivity after flap surgery in rabbits. *Am J Ophthalmol* 2007; 143:255–262.
- 27 Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 2000; 52:269–324.
- 28 Geenen K, Favoreel HW, Nauwynck HJ. Higher resistance of porcine trigeminal ganglion neurons towards pseudorabies virus-induced cell death compared with other porcine cell types in vitro. *J Gen Virol* 2005; 86:1251–1260.
- 29 Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 2009; 61:283–357.
- 30 Ogata K, Shintani N, Hayata-Takano A, et al. PACAP enhances axon outgrowth in cultured hippocampal neurons to a comparable extent as BDNF. *PLoS One*. 2015; 10(3):0120526.
- 31 Monaghan TK, Mackenzie CJ, Plevin R, Lutz EM. PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via cAMP-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases. *J Neurochem*. 2008; 104:74–88.
- 32 Manecka DL, Mahmood SF, Grumolato L, Lihrmann I, Anouar Y. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) promotes both survival and neuritogenesis in PC12 cells through activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway: involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK), calcium, and c-REL. *J Biol Chem*. 2013; 288:14936–14948.
- 33 Sumner AD, Margiotta JF. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) alters parasymphetic neuron gene expression in a time-dependent fashion. *J Mol Neurosci* 2008; 36:141–156.
- 34 Robberecht P, Woussen-Colle MC, De Neef P, et al. The two forms of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP (1–27) and PACAP (1–38)) interact with distinct receptors on rat pancreatic AR 4–2J cell membranes. *FEBS Lett* 1991; 286:133–6.
- 35 Robberecht P, Gourlet P, De Neef P, et al. Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of



- PACAP [(6–38)] as a potent antagonist. *Eur J Biochem* 1992; 207:239–46.
- 36 Tatsuno I, Uchida D, Tanaka T, et al. Maxadilan specifically interacts with PAC1 receptor, which is a dominant form of PACAP/VIP family receptors in cultured rat cortical neurons. *Brain Res* 2001; 889:138–148.
  - 37 Zhou CJ, Shioda S, Yada T, Inagaki N, Pleasure SJ, Kikuyama S. PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways. *Curr Protein Pept Sci* 2002; 3:423–439.
  - 38 Lakk M, Szabó B, Völgyi B, Gábel R, Dénes V. Development-related splicing regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:7825–7832.
  - 39 Pisegna JR, Wank SA. Cloning and characterization of the signal transduction of four splice variants of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor. Evidence for dual coupling to adenylate cyclase and phospholipase C. *J Biol Chem*. 1996;271:17267–17274.
  - 40 Hashimoto M, Nakamura T, Inoue S, et al. Follistatin is a developmentally regulated cytokine in neural differentiation. *J Biol Chem* 1992; 267:7203–7206.
  - 41 Pfister, R.R. Clinical measures to promote corneal epithelial healing. *Acta Ophthalmol. Suppl.* 1992; 202, 73–83.
  - 42 Suzuki K, Saito J, Yanai R, et al. Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22:113–133.
  - 43 Hrdlicková-Cela E, Plzák J, Smetana K Jr, et al. Detection of galectin-3 in tear fluid at disease states and immunohistochemical and lectin histochemical analysis in human corneal and conjunctival epithelium. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:1336–1340.
  - 44 Cao Z, Said N, Amin S, et al. Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds. *J Biol Chem* 2002; 277:42299–42305.
  - 45 Saravanan C, Liu FT, Gipson IK, Panjwani N. Galectin-3 promotes lamellipodia formation in epithelial cells by interacting with complex N-glycans on alpha3beta1 integrin. *J Cell Sci* 2009; 122:3684–3693.
  - 46 Kawakita T, Espana EM, He H, Yeh LK, Liu CY, Tseng SC. Calcium-induced abnormal epidermal-like differentiation in cultures of mouse corneal-limbal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:3507–3512.
  - 47 Wang Z, Yang H, Tachado SD, et al. Phosphatase-mediated crosstalk control of ERK and p38 MAPK signaling in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:5267–5275.

- 48 Ding L, Gao L-J, Gu P-Q, Guo S-Y, Cai Y-Q, Zhou X-T. The role of eIF5A in epidermal growth factor-induced proliferation of corneal epithelial cell association with PI3-k/Akt activation. *Mol Vis* 2011; 17:16–22.
- 49 Zhang W, Shiraishi A, Suzuki A, Zheng X, Kodama T, Ohashi Y. Expression and distribution of tissue transglutaminase in normal and injured rat cornea. *Curr Eye Res* 2004; 28:37–45.
- 50 Li DQ, Chen Z, Song XJ, de Paiva CS, Kim HS, Pflugfelder SC. Partial enrichment of a population of human limbal epithelial cells with putative stem cell properties based on collagen type IV adhesiveness. *Exp Eye Res* 2005; 80:581–590.
- 51 Argüeso, P., Panjwani, N. Focus on molecules: galectin-3. *Exp. Eye Res.* 2011; 92:2-3.
- 52 Hirata A, Ogawa S, Kometani T, et al. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 2002; 62:2554–2560.
- 53 Merindano, M.D., Costa, J., Canals, M., Potau, J.M., Ruano, D. A comparative study of Bowman's layer in some mammals: relationships with other constituent corneal structures. *Eur. J. Anat.* 2002; 6:133–139.
- 54 Hayashi, S., Osawa, T., Tohyama, K. Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians. *J. Morphol.* 2002; 254:247–258.
- 55 Hatchell, D.L., Magolan Jr., J.J., Besson, M.J., Goldman, A.I., Pederson, H.J., Schultz, K.J. Damage to the epithelial basement membrane in the corneas of diabetic rabbits. *Arch. Ophthalmol.* 1983; 101:469–471.
- 56 Lock, J.G., Wehrle-Haller, B., Strömblad, S. Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin. Cancer Biol.* 2008; 18:65-76.
- 57 Kariya, Y., Kawamura, C., Tabei, T., Gu, J. Bisecting GlcNAc residues on laminin-332 down-regulate galectin-3-dependent keratinocyte motility. *J. Biol. Chem.* 2010; 285:3330–3340.
- 58 Welf, E.S., Naik, U.P., Ogunnaike, B.A. A spatial model for integrin clustering as a result of feedback between integrin activation and integrin binding. *Biophys. J.* 2012; 103:1379–1389.
- 59 Uchino, Y., Mauris, J., Woodward, A.M., et al. Alteration of Galectin-3 in tears of patients with dry eye disease. *Am. J. Ophthalmol.* 2015; 159:1027–1035.

- 60 Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J.* 1995; 21:221–232.
- 61 Ridder III WH, Karsolia A. New drugs for the treatment of dry eye disease. *Clinical Optometry* 2015; 7:91–102.